

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG DER BEDEUTUNG DES P-GLYKOPROTEINS
FÜR DIE PENETRATION VON AT₁-REZEPTORANTAGONISTEN
DURCH DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

SVEN OLE SCHUSTER

aus Thedinghausen

Kiel 2015

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Peter Gohlke

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Karsten Witt

Tag der mündlichen Prüfung

10.10.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.: _____

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Im Gedenken an meine Großmutter

*Wenn du willst, dass Menschen ein Schiff bauen,
gib ihnen nicht einen Plan oder Hammer und Nägel,
sondern entzünde in ihnen die Sehnsucht nach dem
weiten offenen Meer.*

Antoine de Saint-Exupéry

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System.....	1
1.2 Angiotensin II und sein Rezeptor.....	4
1.3 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke.....	6
1.3.1 Aufbau.....	6
1.3.2 Funktion.....	7
1.3.3 Aktive Effluxmechanismen.....	8
1.3.4 Hemmung der Efflux-Mechanismen.....	8
1.3.5 P-Glykoprotein.....	9
1.4 Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten	9
1.4.1 Entwicklung.....	9
1.4.2 Struktur.....	10
1.4.3 Wirkung.....	10
1.5 Fragestellung.....	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	13
2.2 Herstellung von Lösungen und Verdünnungsreihen.....	13
2.2.1 Auflistung der verwendeten Substanzen.....	14
2.2.2 Ansatz der Lösungen.....	15
2.3 Operative Verfahren.....	16
2.3.1 Narkotisierung der Tiere.....	16
2.3.2 Anfertigen einer intracerebroventrikulären Kanüle.....	16
2.3.3 Implantation der intracerebroventrikulären Kanüle.....	17
2.3.4 Implantation des venösen Femoralkatheters.....	20

2.4 Applikationstechnik: Intracerebroventrikuläre Injektion.....	22
2.5 Bestimmung der aufgenommenen Trinkmenge.....	23
2.6 Versuchsdurchführung.....	23
2.6.1 Effekt von intravenös applizierten AT1-Rezeptorantagonisten auf die ANG II- induzierte Trinkantwort.....	24
2.6.2 Effekt von intravenös applizierten AT1-Rezeptorantagonisten auf die ANG II- induzierte Trinkantwort bei Hemmung von P-Glykoprotein durch Gabe von Verapamil. .	25
2.7 „Neuetablierung“ der angewandten Methode.....	26
2.7.1 Narkoseverfahren mit Ketamin und Medetomidin.....	26
2.7.2 Postoperative Verhaltensauffälligkeiten und Sterblichkeit.....	27
2.8 Statistische Analyse.....	28
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Effekte des Vehikels (i.v.) auf die Trinkantwort.....	29
3.2 Effekte von Candesartan (i.v.) auf die Trinkantwort.....	30
3.3 Effekte von Telmisartan (i.v.) auf die Trinkantwort.....	31
3.4 Effekte von Losartan (i.v.) auf die Trinkantwort.....	32
3.5 Effekte von Irbesartan (i.v.) auf die Trinkantwort.....	33
4 Diskussion.....	34
4.1 Losartan.....	35
4.2 Telmisartan und Irbesartan.....	36
4.3 Candesartan.....	37
4.4 P-Glykoprotein-Inhibitor: Verapamil.....	37
4.5 P-Glykoprotein.....	38
4.6 Methodenkritik.....	39

5 Zusammenfassung.....	40
6 Literatur.....	42
7 Danksagung.....	51
8 Lebenslauf.....	52
9 Publikationen.....	53

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANG I / II	Angiotensin I / II
AP	Area postrema
AT _{1/2}	Angiotensin-Rezeptor Typ 1 / 2
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
MDR 1	Multidrug-Resistance-Protein 1
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD)
OVL	Organum vasculosum laminae terminalis
Pgp	P-Glykoprotein
PVN	Nucleus paraventricularis
RAS	Renin-Angiotensin-System
SFO	Subfornikalorgan
SHR	spontan hypertensive Ratten
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Entwicklung der AT₁-Rezeptorantagonisten führte neben der klassischen Verwendung als blutdrucksenkendes Medikament auch zu weiteren Forschungsansätzen, um neue Anwendungsbereiche zu ermitteln. Erwähnenswert ist hierbei der Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Pathogenese des Schlaganfalls. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Gabe einiger AT₁-Rezeptorantagonisten sowohl die Größe des ischämischen Schadens eines induzierten Infarktes im Gehirn von Ratten signifikant reduzieren, als auch die motorischen und sensorischen Folgeschäden verringern konnte (Culman et al., 2001; Groth et al., 2003; Dai et al., 1999; Nishimuro et al., 2000). Dies führte im Weiteren zu der Frage, wie die AT₁-Rezeptorantagonisten in das Gehirn gelangen können. Diese Arbeit verfolgt das Ziel dieser Frage genauer nachzugehen und der Erforschung dieses Vorganges zu dienen.

Im Folgenden wird zunächst auf das Renin-Angiotensin-System und den Aufbau und die Funktion der Blut-Hirn-Schranke eingegangen.

1.1 Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System

Das Renin-Angiotensin-(Aldosteron-)System (RAS, RAAS) ist ein Regelkreislauf einer Reihe von Enzymen und Hormonen, welche entscheidend den Elektrolyt- und Wasserhaushalt regulieren und dadurch eine blutdruckregulierende Wirkung erzielen. Renin wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere synthetisiert, von Myoepithelzellen der Vasa afferentia gespeichert und je nach Bedarf in die Blutbahn abgegeben. Der juxtaglomeruläre Apparat der Niere besteht aus den Vasa afferentia, der Macula densa und spezialisierten Mesangiumzellen.

Folgende Einflüsse führen zu einer vermehrten Freisetzung von Renin:

- verminderter Blutdruck
- verringerte Konzentration von Chlorid-Ionen im Harn
- Sympathikusaktivierung
- verringerte glomeruläre Filtrationsrate
- verringerte Durchblutung des Nierenkörperchens

In der Blutbahn spaltet Renin dem in der Leber produzierten Eiweiß Angiotensinogen proteolytisch das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab. Dieses wird daraufhin vom vorwiegend endothelständigen Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in das Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) aufgespalten, welches als Haupteffektorprotein des RAS fungiert und ein breites Wirkspektrum im Organismus entfaltet.

ANG II führt letztlich zu einer Erhöhung des Blutdruckes und bedient sich hierzu folgender Mechanismen:

- Vasokonstriktion der feinen Blutgefäße
- Vasokonstriktion der Vasa efferentia der Niere und dadurch Verringerung der Filtration und somit Verringerung des Wasser- und Elektrolytverlustes
- Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH), auch Arginin Vasopressin (AVP), in der Hypophyse mit folgender Wasserretention
- Ausschüttung von Aldosteron in der Nebennierenrinde, was zur Elektrolytretention in den Nierenkanälchen führt, wodurch der Elektrolytgehalt und folglich auch das Volumen des Blutes steigt
- Erzeugung eines vermehrten Salzhungers und eines starken Durstgefühls im zentralen Nervensystem (ZNS)

Gerade der letzte Punkt wird im Laufe dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung sein. Um ein Überschießen dieses Mechanismus zu verhindern existiert ein System der negativen Rückkopplung, wobei sowohl Aldosteron und ANG II, als auch ein erhöhter Blutdruck zu einer

verringerten Ausschüttung von Renin führen (Übersicht bei De Gasparo et al., 2000; Übersicht bei Paul et al., 2006; Pacurari et al., 2014).

Wie anfänglich beschrieben, scheint das RAS bei der Pathogenese eine wichtige Rolle zu spielen. Es zeigte sich, dass die langfristige Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) sowohl zu einer Verringerung der Größe eines induzierten Schlaganfallareals führte, als auch die Größe des Hirnödems reduzierte (Nishimura et al., 2000). Dies könnte zum Teil auf die strukturellen Veränderungen der zerebralen Gefäßwände durch die Reduzierung des Blutdruckes zurückzuführen sein, welche sich in einer Reduktion der muskulären Gefäßwanddicke und somit einer besseren Durchblutung darstellte (Ito et al., 2001). Allerdings konnten positive Effekte, ebenso bei einer akuten Vorbehandlung und selbst bei einer Gabe von Candesartan 3 Stunden nach einem Schlaganfall festgestellt werden. Diese zeigten sich in einem reduzierten Infarktvolumen und verbesserten neurologischen Ergebnissen (Brdon et al., 2007). Somit zeigt sich, dass das verbesserte Outcome nicht nur auf die Veränderung der Gefäßwände zurückzuführen ist, welche im Übrigen auch bei anderen Antihypertonika, z.B. dem ACE-Hemmer Captopril zu beobachten ist (Ito et al., 2002), sondern ebenso in der akuten Hemmung des AT₁-Rezeptors begründet ist. Der Einfluss auf den Blutdruck scheint hierbei einen nachrangigen, wenn nicht sogar negativen Effekt zu haben, da höhere Dosierungen (3 mg/kg KG) keinen positiven Einfluss auf Infarktgröße und neurologisches Ergebnis haben. Lediglich niedrige Dosierungen (0,33 mg/kg KG) ohne eine nennenswerte Reduzierung des Blutdruckes hatten ein verbessertes neurologisches Ergebnis, mitsamt verringertem Infarktareal zur Folge (Brdon et al., 2007). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Hemmung des AT₁-Rezeptors neben der Verbesserung der zerebralen Durchblutung auch antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkungen erzielt. Gestützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen, welche zeigen konnten, dass eine gezielte Aktivierung der AT₁-Rezeptoren zu einer Verringerung des Blutflusses, einer Überaktivierung des Sympathikus und überschießenden inflammatorischen Reaktionen im Gehirn führten (Ohshima et al., 2013; Villapol et al., 2015). Somit scheint allen voran die Hemmung der Neuroinflammation und die daraus folgende Möglichkeit der Neuroregeneration, mittels Inhibition der AT₁-Rezeptoren, ursächlich für die neuroprotektiven Effekte des AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan zu sein. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Post-Infarkt-Läsionen bei AT₁-Rezeptor-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen deutlich kleiner ausfielen (Villapol et al.,

2015). Darüber hinaus aktivieren die AT₁-Rezeptorantagonisten den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma (PPAR γ), welcher seinerseits die Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen hemmt (Kapadia et al., 2008). Diese beiden Wirkmechanismen der AT₁-Rezeptorantagonisten scheinen daher die vornehmlichen Ursachen der protektiven Wirkung zu sein.

Die reaktiv verstärkte Stimulation des AT₂-Rezeptors hat allenfalls einen zusätzlichen Effekt, welcher der neuronalen Regeneration, Gewebereparatur, Differenzierung sowie Vasodilatation dient, denn diese Rezeptoren sind im adulten Gewebe vergleichsweise selten vertreten (Reinecke et al., 2003; Lucius et al., 1998).

1.2 Angiotensin II und sein Rezeptor

ANG II wurde erstmals von I. H. Page 1940 beschrieben, welcher entdeckte, dass das in der Leber produzierte Angiotensinogen ein Substrat des in der Niere produzierten Renins darstellt. Allerdings konnte erst durch Leonard T. Skeggs gezeigt werden, dass das ursprünglich Hypertensin genannte Angiotensin aus zwei Substanzen besteht, dem weitgehend unwirksamen ANG I und dem gefäßkontrahierenden ANG II (Page und Helmer, 1940; Skeggs et al., 1954).

Das RAS ist ein in mehreren Organen vorkommendes System. Erwähnenswert ist hierbei, dass alle Verbindungen des RAS auch im ZNS nachweisbar sind und ANG II vorwiegend in den Astrozyten synthetisiert wird (McKinley et al.; 2003). ANG II führt über die Bindung an den AT₁-Rezeptor zu den oben genannten Effekten. Es bindet ebenfalls an den AT₂-Rezeptor, welcher im Sinne einer negativen Rückkopplung, die Effekte des AT₁-Rezeptors zu reduzieren vermag. Ferner wirkt er antiproliferativ und somit entgegen der hypertrophischen und proliferativen Eigenschaft des AT₁-Rezeptors.

ANG II wird mittels der Aminopeptidase A in mehreren Stufen zu inaktiven Substanzen abgebaut. Hierbei wird zunächst Angiotensin III gebildet, welches zwar noch an die gleichen Rezeptoren bindet wie ANG II, allerdings mit einer deutlich geringeren Affinität. In einem weiteren Abbauschritt entsteht Angiotensin IV, welches an den Angiotensin-IV-Rezeptor bindet und hierüber profibrotische Effekte auslösen soll. Dieser Rezeptor ist jedoch noch weitgehend unerforscht.

Die genannten Rezeptortypen AT₁ und AT₂ sind die beiden Subtypen, an die das aktive ANG II bindet. Beides sind membranständige Rezeptoren mit 7 transmembranären Domänen. Der AT₁-Rezeptor ist hierbei ein typischer G-Protein gekoppelter Rezeptor, wohingegen der AT₂-Rezeptor zwar ebenfalls G-Protein gekoppelt zu sein scheint, allerdings atypische intrazelluläre Signaltransduktionen mit zahlreichen Bindungsproteinen aufweist (Senbonmatsu et al., 2003). Die genetische Kodierung des AT₁-Rezeptors beim Menschen liegt auf dem Chromosom 3 und bei der Ratte auf den Chromosomen 17 und 2 (Kim und Iwao, 2000).

Der AT₁-Rezeptor wird bei Nagetieren noch nach AT₁-a und AT₁-b unterschieden, welche in ihrer Verteilung im Gehirn variieren (Culman et al., 2001). Es zeigte sich, dass die Aktivierung des AT₁-a-Rezeptors vornehmlich zu einem Blutdruckanstieg führte, wohingegen die Trinkantwort der Aktivierung des AT₁-b-Rezeptors zuzuschreiben ist (Davisson et al., 2000). Der AT₁-a-Rezeptor entspricht dem „klassischen“ AT₁-Rezeptor, während der AT₁-b-Rezeptor deutliche Unterschiede hinsichtlich seines Bindungsverhaltens aufweist.

AT₁ und AT₂-Rezeptoren sind im Gewebe deutlich unterschiedlich verteilt, so findet sich der AT₂-Rezeptor hauptsächlich in fetalem Gewebe und verliert im adulten Gewebe zunehmend gegenüber dem dominierenden AT₁-Rezeptor an Bedeutung. Dies lässt darauf schließen, dass der AT₂-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der fetalen Differenzierung spielt, da dieser beispielsweise im myokardialen Remodeling nach einem Myokardinfarkt verstärkt auftritt (Kaschina et al., 2014).

Verschiedene Bindungsstudien zeigten, dass die Angiotensin-Rezeptoren bei Mensch und Ratte ähnlich verteilt sind, sodass sich der Rattenorganismus durchaus als Versuchsobjekt zur späteren Übertragung auf den Menschen eignet (Dominiak und Unger, 1999).

Der AT₁-Rezeptor, welcher für die zentralen und kardiovaskulären Reaktionen des intrazerebroventrikulären ANG II verantwortlich ist, wird vor allem in den zirkumventrikulären Organen, genauer dem Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), dem Subfornikalorgan (SFO) und der Area postrema (AP) exprimiert. Darüber hinaus kommt der AT₁-Rezeptor an dem Nucleus preopticus, der Lamina terminales und einem Streifen periventrikulären Gewebes an der vorderen Wand des dritten Ventrikels vor (Tsutsumi und Saavedra, 1991).

Diese Areale sind mit dem Hypothalamus, dem Nucleus supraopticus (SON), Nucleus paraventricularis (PVN) und dem limbischen System verbunden. Die anatomischen Verbindungen zum preoptischen anterioren Thalamus und dem limbischen System führen letztlich zur Initi-

ierung der Trinkantwort, wohingegen die Aktivierung des SON und des PVN zur Ausschüttung des Vasopressins führt (Culman et al., 2001).

Die genaue Erläuterung der intrazellulären Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten, weshalb nur kurz die wichtigsten intrazellulären Signalwege beschrieben werden. Die Bindung des ANG II an den AT₁-Rezeptor aktiviert vier klassische Signalkaskaden, die Phospholipasen A₂, C, D und die L-Typ-Kalziumkanäle. Die Adenylatcyclase wird üblicherweise blockiert (Dinh et al., 2001).

1.3 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke

Als Entdecker der Blut-Hirn-Schranke gilt der Mediziner Paul Ehrlich, welcher feststellte, dass nach intravenöser Injektion eines Farbstoffes alle Organe bis auf das Gehirn angefärbt wurden und somit bewies, dass eine dichte Barriere zwischen dem Körperkreislauf und dem Gehirn existiert (Ehrlich, 1885). Dieses Kapitel befasst sich genauer mit dem Aufbau und den für diese Arbeit entscheidenden Funktionen der Blut-Hirn-Schranke.

1.3.1 Aufbau

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine physiologische Barriere zwischen ZNS und dem Blutkreislauf. Sie dient dabei im wesentlichen der Homöostase des Gehirns und grenzt somit das Gehirn von den im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, Toxinen und Botenstoffen ab.

Die anatomischen Trennschichten zwischen Blut und ZNS werden von dem Kapillarendothel, der Basallamina der Kapillare und der Gliagrenzmembran der Astrozyten-Endfüße gebildet. Hierbei ist es vor allem das Kapillarendothel, welches durch dichte Zell-Zell-Verbindungen (sogenannte „tight junctions“) die Funktion einer Diffusionsbarriere darstellt. Die Permeabilität des neuronalen Kapillarendothels ist dadurch 100fach niedriger als die des nicht-neuronalen Kapillarendothels.

Die Gliagrenzmembran ist kein Bestandteil dieser Diffusionsbarriere, jedoch sind die Astrozyten, die mit ihren Endfüßen die Kapillaren umgeben, von entscheidender Bedeutung für Ausbildung und Erhaltung der spezifischen Barriere-Eigenschaften des Kapillarendothels (Lüllmann-Rauch, 2006).

Es konnte in Transplantationsversuchen gezeigt werden, dass periphere Kapillaren, welche in das ZNS verpflanzt wurden, den dort befindlichen tight-junctions-Typus annahmen und umgekehrt Kapillaren, welche dem ZNS entnommen und peripher transplantiert wurden, Fensterungen ausbildeten und somit das Merkmal der strikten Diffusionsbarriere verloren. Das neuronale Gewebe scheint somit entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung des Endothels zu haben (Stewart und Wiley, 1981).

Es existiert keine Diffusionsbarriere zwischen dem Extrazellularraum des ZNS und den Liquorräumen, womit sie einen gemeinsamen Verteilungsraum darstellen. Folglich ist neben der Blut-Hirn-Schranke (BHS) auch eine Blut-Liquor-Schranke (BLS) notwendig, die in den Ventrikeln durch das Epithel des Plexus choroideus und in den äußeren Liquorräumen durch das Neurothel der Arachnoidea gebildet wird. In beiden Regionen dienen ebenfalls tight junctions als Diffusionsbarriere (Rapoport, 1976).

1.3.2 Funktion

Die Funktion der BHS und der BLS umfassen neben der Homöostase auch die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Sauerstoff bei gleichzeitiger Beseitigung der Abbauprodukte, welche im Gehirn aufgrund des ungleich höheren Nährstoffbedarfes verstärkt anfallen. Das Gehirn hat bei einem Körpermasseanteil von 2% einen Nährstoffbedarf von mindestens 20% des Gesamt-Nährstoffbedarfs (Ohtsuki, 2004).

Die Permeabilität der BHS ist hierbei vor allem von der Fettlöslichkeit der jeweiligen Substanz abhängig (Oldendorf, 1974). Es konnte zwar festgestellt werden, dass mit zunehmender Fettlöslichkeit auch die Permeabilität ansteigt, allerdings stellt das Molekulargewicht einen weiteren limitierenden Faktor der Permeabilität dar, welcher über 700 Da keine weitere Permeabilität zulässt (Pardridge, 1993).

Lipophile Substanzen können somit die Blut-Hirn-Schranke weitgehend ungehindert überwinden. Es bedarf hingegen aktiver Transportmechanismen für Elektrolyte, Hormone und vor allem Glukose, welche einen selektiven und kontrollierten Stoffaustausch zulassen. Einer dieser Transporter ist der Glut-1-Transporter, welcher die Glucose, den Hauptenergielieferanten des Gehirns, von der luminalen zur abluminalen Seite der BHS transportiert (Wolf et al., 1996; Devraj et al., 2011).

1.3.3 Aktive Effluxmechanismen

Die BHS bildet zwar eine zuverlässige Barriere gegenüber hydrophilen Substanzen, allerdings können Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht und hoher Fettlöslichkeit die BHS mittels passiver Diffusion leicht überwinden.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine Reihe von Substanzen, darunter auch mehrere Medikamente, im Gehirn deutlich geringere Wirkstoffspiegel erreichen als deren Größe und Lipophilie erwarten lassen würde.

Für die Konzentration einiger Substanzen ist somit neben dem Abbau, vor allem der aktive Auswärtstransport entscheidend. Einer der ersten beschriebenen Effluxmechanismen war der Auswärtstransport von Jodid und Thiozyanid (Pollay und Davson, 1963). Als wichtige Efflux-Transporter haben sich hierbei das P-Glykoprotein (Pgp) und das Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) erwiesen. Diese gehören zu einer kleinen Gruppe von Membranproteinen, welche die Konzentration der passiv diffundierten lipophilen Substanzen im Gehirn verringern.

Im Gegensatz zu den Einwärtstransportern der BHS sind die genannten Effluxtransporter deutlich unspezifischer und sind somit in der Lage eine Reihe verschiedener Substanzen zu transportieren, deren einzige Gemeinsamkeit ihre Lipophilie zu sein scheint.

1.3.4 Hemmung der Efflux-Mechanismen

Es gelingt einer Reihe von Substanzen in die Membran des Kapillarendothels vorzudringen, allerdings werden diese, sofern sie Substrate der Effluxpumpe Pgp sind, wieder aus der luminalen Membran heraustransportiert. Dieser Auswärtstransport kann mithilfe eines Pgp-Inhibitors unterbunden werden. Ein bekannter Inhibitor ist hierbei der Calciumantagonist Verapamil. Es konnte sowohl *in vivo* (Drion et al., 1996) als auch *in vitro* (Fenart et al., 1998) an einem BHS-Modell die Passage zytostatisch wirksamer Vinca-Alkaloiden erhöht werden. Im Gegensatz zu anderen Inhibitoren, wie Sulfhydrylpurine, welche den Transporter direkt hemmen, fungiert das Verapamil als Substrat mit einer sehr hohen Affinität und dient dadurch als Inhibitor (Föger, 2009).

1.3.5 P-Glykoprotein

Das P-Glykoprotein (Pgp), auch bekannt als Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR 1), ATP-Binding Cassette Sub-family B Member 1 (ABCB1) und Cluster of Differentiation 243 (CD243), ist eine ATP-abhängige Effluxpumpe mit einer breiten Substratspezifität. Entdeckt wurde es 1976, wobei gezeigt werden konnte, dass ein Überangebot an Pgp zu einer Resistenz von Tumorzellen gegenüber antikanzerogenen Mitteln führt (Juliano und Ling, 1976). Die physiologische Funktion des Pgp's besteht vor allem in dem Schutz der Zellen bzw. des Organismus gegenüber toxischen Verbindungen (Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1997). Das Pgp kommt sowohl in der Zellmembran von Tieren als auch von Pilzen und Bakterien vor. Es wird vor allem an der Bürstensaummembran des Darmepithels, der Gallengangsmembran der Hepatozyten, an der luminalen Membran der proximalen Tubuli der Niere und an den Endothelzellen der Kapillaren, welche die BHS bilden, exprimiert. Das Pgp wird beim Menschen durch das ABCB1-Gen codiert (Ueda et al., 1987) und gehört zu den transmembranären ABC-Transportern, welche in sieben Subfamilien eingeteilt sind, wobei Pgp zur MDR/TAP-Subfamilie gehört (Klein et al., 1999). Wie alle Proteine der ABC-Transporter-Familie besitzt auch das Pgp zwei große zytoplasmatische Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) und zwei hydrophobe Transmembrandomänen (Taylor et al., 2001).

1.4 Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten

In diesem Kapitel soll vor allem auf die Entwicklung, Struktur und Wirkung der ANG-II-agonisten eingegangen werden.

1.4.1 Entwicklung

Das RAS ist aufgrund seiner entscheidenden Bedeutung für die Blutdruckregulation ein wichtiger Angriffspunkt für die meisten Antihypertensiva. Dies führte im Jahre 1976 zur Entwicklung und Patentierung von Captopril, dem ersten Vertreter der sogenannten ACE-Hemmer. Diese hemmen irreversibel das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) und infolgedessen sehr effizient die Bildung von ANG II. Dadurch verhindern sie die oben beschriebenen Wirkungen, allen voran die Vasokonstriktion (Antonaccio, 1982). Die ACE-Hemmer sind auch heute noch

eine entscheidende Säule in der Behandlung der Hypertonie, besitzen indes vereinzelt einen nebenwirkungsträchtigen Effekt; Die Inhibition des ACE hemmt zeitgleich nicht nur die ANG II-Bildung, sondern ebenfalls die Spaltung und Inaktivierung des Bradykinins und der Substanz P, welche nach Akkumulation zu einem starken, trockenen Reizhusten und einem Angioödem führen können (Fox et al., 1996). Diese Erkenntnis, bei gleichzeitiger Identifizierung und funktioneller Analyse der ANG-II-Rezeptoren mittels ANG-II-Analoga auf peptidischer Basis, mündete in der Entwicklung der ersten AT₁-Rezeptorantagonisten, welche mit Losartan 1995 erstmals auf dem deutschen Arzneimittelmarkt zugelassen wurden.

Tabelle 1: AT₁-Rezeptorantagonisten nach Zulassungsjahren

1995	Losartan
1997	Valsartan, Eprosartan, Irbesartan, Candesartan
1999	Telmisartan
2001	Olmесartan
2012	Azilsartan

1.4.2 Struktur

Im Gegensatz zu den ersten peptidischen AT₁-Rezeptorantagonisten, welche bei oraler Applikation im Magen zersetzt wurden, gelingt den nicht-peptidischen Sartanen die Passage in den Blutkreislauf. Ihre Grundstruktur lässt sich in substituierte Biphenyle (Telmisartan), substituierte Biphenyltetrazole (Losartan, Irbesartan, Candesartan, Olmesartan und Valsartan) und Nicht-Biphenylstrukturen (Eprosartan) unterscheiden (Vauquelin et al., 2006).

1.4.3 Wirkung

Die AT₁-Rezeptorantagonisten binden hochselektiv an den AT₁-Rezeptor. Hierbei binden sie als kompetitive Hemmstoffe, weshalb sie mittels entsprechend hoher ANG II-Konzentrationen auch wieder verdrängt werden können. Dies geschieht abhängig von der Substanzklasse unterschiedlich schnell, was sich beispielsweise an der ausgesprochen langen Dissoziationshalbwertszeit des Candesartans zeigt, welches bis zu 24 Stunden an dem Rezeptor verbleibt. Die Dissoziationshalbwertszeiten sind somit absteigend in folgender Reihenfolge: Candesartan

> Telmisartan \approx EXP3174 > Irbesartan > Losartan (Vanderheyden et al., 2000; Van Liefde und Vauquelin, 2009).

1.5 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bedeutung des Transportproteins Pgp für die Penetration der AT₁-Rezeptorantagonisten Telmisartan, Candesartan, Losartan und Irbesartan durch die Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen. Medizinisch bedeutsam ist diese Frage vor allem im Hinblick auf die neuroprotektive Wirkung einiger AT₁-Rezeptorantagonisten bei systemischer Vorbehandlung oder akuter Gabe im Verlauf einer fokalen zerebralen Ischämie.

Frühere Forschungsansätze haben gezeigt, dass die genannten AT₁-Rezeptorantagonisten deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Penetrationsfähigkeit in das ZNS aufwiesen. So penetrierte Candesartan bei deutlich geringeren Dosierungen, obgleich hydrophil und somit in der Theorie geringer permeabel, wesentlich besser die Blut-Hirn-Schranke als Losartan, Telmisartan und Irbesartan (Gohlke et al., 2002; Brolund, 2008)

Der erste Teil der Arbeit befasst sich daher mit der Penetrationsfähigkeit der einzelnen intraperitoneal applizierten AT₁-Rezeptorantagonisten. Hierzu wurde die nach i.c.v.-Gabe von ANG II zentral vermittelte Trinkantwort gemessen. Studien haben gezeigt, dass der Multi-Drug-Transporter Pgp als Transporter einiger AT₁-Rezeptorantagonisten in Frage kommt und somit auch die Differenzen hinsichtlich der Permeabilität zwischen den vier AT₁-Rezeptorantagonisten erklären könnte.

Der zweite Teil der Arbeit untersucht deshalb den Einfluss des Pgp's auf die Penetrationsfähigkeit des AT₁-Rezeptorantagonisten unter Verwendung des Pgp-Inhibitors Verapamil, ebenfalls mittels Messung der Trinkantwort.

In beiden Versuchsreihen wurde die Trinkantwort 0,5 und 4 Stunden nach der Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten gemessen, um ein unterschiedlich schnelles Anfluten der verschiedenen Antagonisten besser vergleichen zu können.

Substrate des Pgp's sollten durch den aktiven Auswärtstransport eine geringere ZNS-Penetration aufweisen. Somit würde eine Hemmung des Pgp's zu einer verstärkten Penetration führen und sich letztlich durch eine verringerte Trinkantwort beweisen lassen.

Eine klinische Relevanz könnte in der möglichen Anwendung in der akuten Schlaganfallthera-

pie liegen, wobei die erhöhten Konzentrationen des AT₁-Rezeptorantagonisten im ZNS bei gleichzeitig geringerer Wirkstoffgabe aufgrund der Hemmung des Auswärtstransportes die zukünftige Anwendung möglich erscheinen lässt.

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die genauen Abläufe des Versuchsvorhaben, vor allem die OP-Techniken und die Darreichungsformen der Medikamente, näher erläutert.

2.1 Tiere und Tierhaltung

Es wurden männliche Wistar Ratten der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bzw. deren Nachzuchten mit einem Körpergewicht von 300-350 g verwandt. Bis zum Beginn der Versuche wurden die Tiere in großen Makrolonkäfigen (100 x 30 cm) zu jeweils 5 Tieren gehalten. Die Tiere wurden frühestens eine Woche nach Lieferung den Versuchen zugeführt um verfälschten Ergebnissen aufgrund ungenügender Eingewöhnung und Futterumstellung vorzubeugen. Während der Versuchsreihe wurden die Tiere in Einzelkäfigen (20 x 26 cm) gehalten, um gegenseitige Beschädigungen der Implantate zu verhindern. Der Tierstall wurde hinsichtlich Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Luftdruck und Geräuschpegel konstant gehalten. Die Beleuchtungszeit erstreckte sich von 6 Uhr morgens bis 18 Uhr abends. Die Tiere erhielten ein ernährungsphysiologisch ausgewogenes Standardfutter (ssniff R/M-H, Natriumgehalt 0,24 %) und Trinkwasser in beliebiger Menge. Die Käfige wurden mindestens alle drei Tage gereinigt. Die durchgeführten Tierversuche dieses Dissertationsvorhabens wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume unter den Aktenzeichen V 312-72241.121-22 (23-2/10) und V 311-72241.121-22 (38-3/12) genehmigt und in enger Kooperation mit dem Tierschutzbeauftragten Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß durchgeführt.

2.2 Herstellung von Lösungen und Verdünnungsreihen

An dieser Stelle wird auf die Herkunft der Substanzen und deren weitere Verwendung eingegangen. Hierbei liegt ein besonderes Augenmerk auf den Lösungs- und Verdünnungsreihen

2.2.1 Auflistung der verwendeten Substanzen

Narkotika

Chloralhydrat	Ferak Berlin GmbH (Berlin, Deutschland)
Ketanest	Pfizer Deutschland GmbH (Berlin, Deutschland)
Medetomidin	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf, Deutschland)

AT₁-Rezeptoragonisten und -antagonisten

Angiotensin II (ANG II)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Candesartan	AstraZeneca GmbH (Möln dal, Schweden)
Telmisartan	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim, Deutschland)
Losartan	MSD Sharp & Dohme GmbH (Haar, Deutschland)
Irbesartan	Sanofi-Aventis (Paris, Frankreich)

Inhibitor des P-Glykoproteins

Verapamil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
-----------	---

Sonstige Substanzen

Heparin	Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid 3 %	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

2.2.2 *Ansatz der Lösungen*

Chloralhydrat: Es wurden 4 g Chloralhydrat in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

Angiotensin II: Es wurden 100 ng ANG II in 1 µl physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Losartan: Für die intravenöse Gabe wurden 10 mg Losartan in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Hiervon wurden 0,5 ml/100 g KG verabreicht. Dies entspricht einer Gabe von 10 mg/kg KG.

Irbesartan: Für die intravenöse Gabe wurden 30 mg Irbesartan in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Um die vollständige Lösung zu erreichen wurde Natriumhydroxid (NaOH) zugesetzt und ein pH-Wert von etwa 8,5 eingestellt. Hiervon wurden 0,5 ml/100 g KG verabreicht. Dies entspricht einer Gabe von 30 mg/kg KG.

Candesartan: Es wurde zuerst eine Stammlösung angesetzt. Hierzu wurden 4 mg Candesartan in 1 ml 0,05 molaren Natriumcarbonatlösung gelöst und später mit 29 ml physiologischer Kochsalzlösung angesetzt. Hiervon wurden 0,25 ml/100 g KG verabreicht. Dies entspricht einer Gabe von 0,33 mg/kg KG.

Telmisartan: Es wurde zuerst eine Stammlösung angesetzt. Hierzu wurden 40 mg Telmisartan in 4 ml 0,5 molaren Natriumhydroxidlösung (NaOH) gelöst und mit einer 0,5 molaren Kochsalzlösung (HCl) auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt. In einem zweiten Schritt wurde diese Lösung mit einer Natriumhydroxidlösung, welche ebenfalls auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt wurde, auf 10 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde nochmals mit der NaOH-Lösung (pH 10,5) um den Faktor 10 verdünnt. Somit enthielt die Lösung 0,4 mg/ml Telmisartan. Hiervon wurden 0,25 ml/100 g KG verabreicht. Dies entspricht einer Gabe von 1 mg/kg KG.

Verapamil: Es wurden 10 mg Verapamil in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Hier-von wurden 0,1 ml/100 g KG verabreicht. Dies entspricht einer Gabe von 10 mg/kg KG.

2.3 Operative Verfahren

Das folgende Kapitel dient der Erläuterung der genauen Operationsverfahren samt Narkosetechniken und der Vorbereitung der notwendigen Materialien.

2.3.1 *Narkotisierung der Tiere*

Zur Narkose der Tiere wurde eine 4%ige Chloralhydratlösung genutzt, welche mittels Einmalspritze (5 ml) und 20G-Einmalkanüle (0,4 x 20 mm) intraperitoneal (i. p.) appliziert wurde. Die Substanzmenge betrug 400 mg/kg KG.

Nach einigen Minuten trat die Bewusstlosigkeit ein und hielt regelhaft ca. 60 Minuten.

In einigen Fällen, gerade bei größeren Tieren, musste eine Folgedosis, welche aufgrund der Anreicherung im Fettgewebe deutlich geringer ausfallen musste, appliziert werden.

2.3.2 *Anfertigen einer intracerebroventrikulären Kanüle*

Zu Herstellung der Kanüle wurde ein 30 mm langes Stück Polypropylenschlauch verwendet, welches auf einen feinen Draht gezogen und mithilfe einer Heißluftdüse am distalen Ende lokal erhitzt wurde. Durch leichtes Drehen und Zusammenschieben entstand eine knotenartige

Auftreibung, welche die spätere Fixation der Kanüle im zweiten Seitenventrikel sicherstellte.

Der innen liegende Draht gewährleistete dabei die Durchgängigkeit der Kanüle.

Die Kanülen wurden daraufhin mit einer Skalpellklinge und einem Millimeterpapier rechts und links der knotenartigen Auftreibung auf die Längen 5 mm und 20 mm gekürzt.

2.3.3 *Implantation der intracerebroventrikulären Kanüle*

Zur Implantation der intracerebroventrikulären (i.c.v.) Kanüle wurden folgende Instrumente und Materialien benötigt:

- Rasierapparat
- Stereotaktisches Instrument
- Skalpellklinge
- Einmaltupfer und Einmallabortücher
- 3 %ige Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2)
- zwei Handbohrer (0,8 mm und 1,2 mm DD)
- zwei verzinkte Messingschrauben (Länge: 3 mm, DD: 1 mm)
- Uhrmacherschraubenzieher und feine Pinzette
- feiner Filzstift, wasserfest
- TRIM (Trimethylolpropantrimethacrylat): autopolymerisierender Kunststoff (Bosworth Company, Skokie, Illinois, USA)
- feiner Führungsdraht zum Einstellen der Koordinaten auf der Schädelkalotte der Ratte und zum Einführen der i.c.v.-Kanüle in den Seitenventrikel
- kleiner Spatel und Gumminapf zum Anrühren und Auftragen des Autopolymerates
- Polypropylenschlauch PP 20, ID 0,38 mm, OD 1,09 mm (Portex, London, UK)

Die Ratten wurden mit Hilfe des beschriebenen Chloralhydrates narkotisiert. Die Haut über der Kalotte wurde rasiert und der Kopf des Tieres im stereotaktischen Gerät fixiert. Die Haut wurde mit einer Pinzette angelupft und mit einem Skalpell kreisrund aufgeschnitten. Nach Entfernung der Haut und der Gala aponeurotica wurde die Sutura sagittalis samt Sutura coro-

nalis freipräpariert. Es erfolgte eine Blutstillung mit Wattestäbchen und vor allem durch Aufbringung einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung, welche eine unmittelbare Koagulation erzielte.

Nach Reinigung und Trocknung des Schädelknochens stellte sich der Schnittpunkt der Sutura sagittalis und der Sutura coronalis, das sogenannte Bregma, eindeutig dar und konnte somit als Orientierungspunkt zur Bestimmung der Koordinaten für die Implantation der i.c.v.-Kanüle genutzt werden. Zu diesem Zweck wurde der Führungsdraht in den Führungsarm des stereotaktischen Gerätes eingespannt und genau über dem Bregma ausgerichtet (siehe Abb. Nr. 1). Das Bregma diente als Ausgangspunkt zur Positionierung des Bohrloches. Hierzu wurde der Führungsdraht mit Hilfe der Feinmechanik des stereotaktischen Gerätes 1,3 mm nach lateral und 0,6 mm nach dorsal positioniert und dieser Punkt auf der Kalotte mit einem feinen Filzstift markiert. Die Koordinaten ergaben sich aus der topographischen Anatomie des Rattehirns (Paxinos und Watson, 1980), welche an dieser Position in einer Tiefe von 5 mm die maximale Weite des zweiten Seitenventrikels darstellt und somit als Zielkoordinate fungierte. Diese Markierung diente als Orientierungspunkt für die erste Vorbohrung mit einem feinen Bohrer (0,8 mm), welche im Anschluss mit einem zweiten dicken Bohrer (1,2 mm) erweitert wurde. Dieser Schritt beugte einem Splintern der Kalotte vor. Darüber hinaus wurden mit dem feineren Bohrer noch zwei weitere Bohrungen beidseits der Sutura sagittalis, etwa 5 mm dorsal vorgenommen, die der Anbringung zweier Messingschrauben dienten, die mit einem Uhrmacherschraubenzieher vorsichtig eingebracht wurden. Hierbei musste darauf geachtet werden, den Schrauben einen guten Halt zu bieten, die Kalotte aber nicht zu durchbrechen. Die präparierte i.c.v.-Kanüle wurde mit dem kurzen Ende Richtung Kalotte auf den Führungsdraht geschoben und es erfolgte das Einführen der i.c.v.-Kanüle in die Hauptbohrung durch Absenken der Feinmechanik. Die Auftreibung an der i.c.v.-Kanüle verhinderte hierbei ein Absinken der Kanüle über die gewünschte Tiefe hinaus und stellte so eine präzise Positionierung der Kanüle in der Mitte des Seitenventrikels sicher. In einem kleinen Gumminapf wurde der autopolymerisierende Kunststoff angerührt und zeitnah mit dem Spatel auf dem freigelegten Schädeldach verteilt. Hierbei wurden die im Knochen befestigten Schrauben eingeschlossen und dienten somit maßgeblich der Fixation des Kunststoffes bzw. der Kanüle auf der glatten Oberfläche des Schädeldaches.

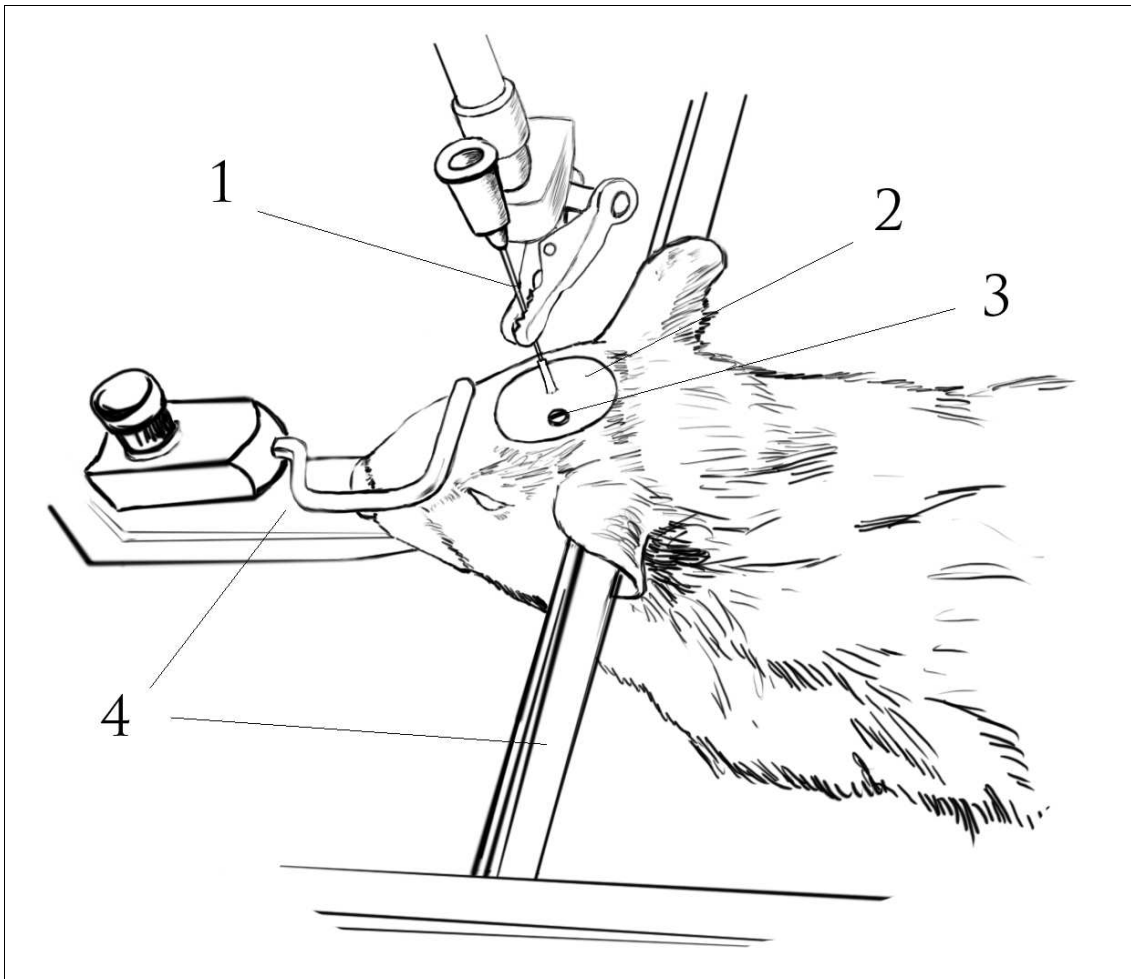


Abb.1: Das Versuchstier im stereotaktischen Gerät (4) unter Narkose fixiert. Führungsdraht samt Katheter (1) mit TRIM-Kunststoff (2) fixiert und einer weiteren Schraube (3) als Sicherung. Zeichnung: Lilija Tolstych

Nach vollständiger Aushärtung des Kunststoffes wurde der Führungsdraht aus der Kanüle entfernt und das Tier aus dem stereotaktischen Gerät gelöst. Eine weitere Versorgung des Wundrandes war nicht notwendig, da der Kunststoff an den Wundrand bündig ansetzte. Die Operationsdauer betrug durchschnittlich 15-20 Minuten. Die postoperative Erholungsphase betrug mindestens 5 Tage.

2.3.4 Implantation des venösen Femoralkatheters

Zur Implantation der intraventrikulären (i.v.) Kanüle wurden folgende Instrumente und Materialien benötigt:

- Operationsunterlage
- Klebestreifen und Rasierapparat
- NaCl-Heparinlösung (25.000 IE Heparin auf 1000 ml NaCl 0,9%ig)
- Chirurgische Pinzette
- Zwei kleine, gebogene, stumpfe Pinzetten
- Eine gerade chirurgische Schere
- Eine kleine, gebogene, stumpfe Schere
- Irisschere
- Gefäßpinzette
- Geschützte Klemme
- Nahtmaterial (Nadelhalter, Nadel und Baumwollnahtmaterial (4/0))
- Venöser Femoralkatheter: Polypropylenschlauch PP 50, ID 0,58 mm, OD 0,96 mm (Portex, London, UK)
- Einmalspritze (1 ml) und 20G-Einmalkanüle (0,4 x 20 mm mit abgetrennter Spitze) zum Spülen der Katheter mit NaCl-Heparinlösung
- Trokar
- Wattestäbchen und Tupfer, unsteril
- Handfeuerzeug
- Mikroskop
- Jodlösung

Die Tiere wurden ebenfalls wie beschrieben mit Chloralhydrat narkotisiert. Die rechte Leistenbeuge wurde rasiert und das Tier in Rückenlage auf die Unterlage gelegt, wobei die Extremitäten abduziert und mit Klebeband fixiert wurden. Es wurde ein etwa 1 cm langer Hautschnitt quer zum Verlauf des Nerven- und Gefäßstranges gesetzt und der Nerven- und

Gefäßstrang, bestehend aus V. femoralis, A. femoralis und N. femoralis, aufgezehlt von medial nach lateral, stumpf mit Schere und Tupfer freipräpariert. Daraufhin wurde die V. femoralis mit der stumpfen gebogenen Pinzette vorsichtig aus der Bindegewebsscheide herausgelöst und auf einer Länge von ca. 10 mm freigelegt. Hierbei musste vor allem auf die Unversehrtheit des N. femoralis geachtet werden, da dieser aufgrund seiner filigranen Struktur sehr leicht zu schädigen ist.

Zur Implantation des Katheters musste das Gefäß nach sorgfältiger Darstellung zunächst mit zwei feinen Baumwollfäden an seinem proximalen und distalen Ende umschlungen werden. Um den Gefäßabschnitt zu füllen wurde zunächst die proximale und dann die distale Schlinge angezogen. Die Knoten wurden indes noch nicht angezogen um ein eventuelles Wiederauffüllen zu ermöglichen und um den Katheter später im Gefäß zu fixieren.

Das Gefäß wurde mit der Irisschere inzidiert und die entstandene Schnittstelle vorsichtig erweitert um ein Einbringen des Katheters zu ermöglichen. Der Katheter wurde mindestens 35 mm, bis zu einer vorher markierten Stelle, vorgeschoben und mit Hilfe der proximalen Schlinge fixiert. Es folgte eine Probe auf Dichtigkeit und korrekte Lage des Katheter durch Spülen mit einer NaCl-Heparinlösung. Daraufhin wurden sowohl die proximale Schlinge mit dem Katheter verknotet als auch das distale Ende des Gefäßes verschlossen und ebenfalls an dem Katheter fixiert, um ein späteres Herausgleiten zu verhindern. Nach dem Abklemmen des Katheters mit einer Gefäßklemme wurde er an seinem anderen Ende mit einem Feuerzeug erwärmt und durch Fingerdruck fest verschlossen.

Das Tier wurde nun von der Arbeitsplatte gelöst und auf den Bauch gelegt. Im Nacken des Tieres wurde ein ca. 5 mm langer Hautschnitt gesetzt und mittels eines Trokars eine subkutane Verbindung zwischen Nacken und Leiste hergestellt. Durch diese Verbindung wurde der Katheter von der Leiste in den Nacken des Tieres gelegt. Hierbei wurde der Katheter an dem Trokar befestigt und diente somit als Führungshilfe. Das Ende des Katheters wurde direkt nach seinem Austritt aus der Inzision am Nacken mit einem ca. 5 mm breiten Klebeband umwickelt und sowohl rechts als auch links des Katheters mit einem Nadelhalter flach gepresst. Diese Stellen wurden mit Nadel und Faden durchstoichen und mit der Haut im Nacken fixiert, wodurch sich auch die Inzision im Nacken mit verschloss. Die Inzision der Leiste wurde mittels Einzelknopfnähte verschlossen und eine Jodlösung großflächig auf das Wundgebiet aufgetragen um späteren Infektionen vorzubeugen. Die Operationsdauer betrug ca. 20 min wobei die

intracerebrospinale Implantation in aller Regel in der selben Narkose vorgenommen wurde, wodurch die postoperative Erholungsphase von 24 Stunden auf 5 Tage verlängert werden musste.

2.4 Applikationstechnik: Intracerebroventrikuläre Injektion

Zur Injektion der zu verabreichenden Substanz wurde ein Injektionssystem verwendet. Dieses besteht aus einer 25 μ l Hamilton-Spritze, welche an einen ca. 30 cm langen PP20-Schlauch angeschlossen und mit einer präparierten 20 G-Kanüle ohne Spitze versehen wurde. Dieses System wurde mit einer isotonischen Kochsalzlösung blasenfrei gefüllt, anschließend wurde Luft, Kochsalzlösung und die zu injizierende Substanz in folgender Reihenfolge aufgezogen.

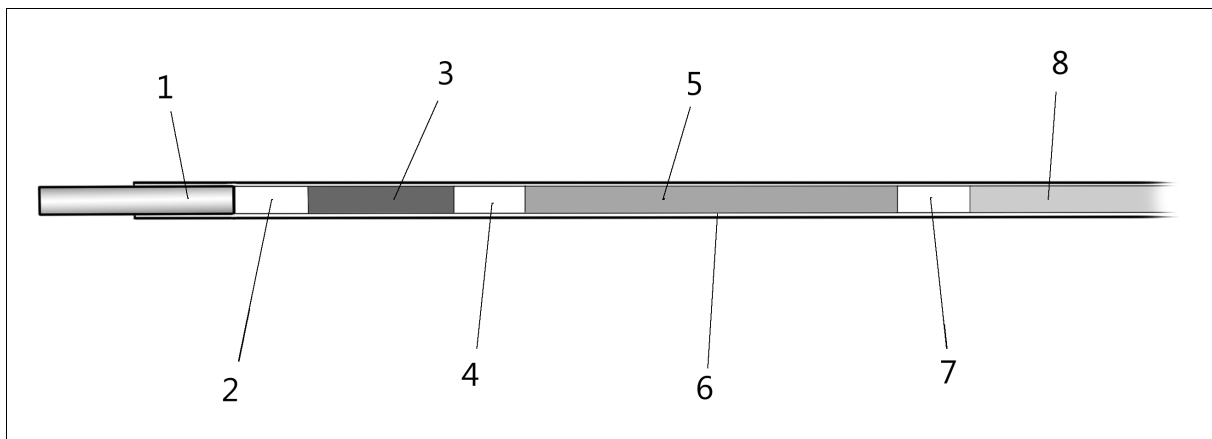


Abb. 2: **1)** 20G-Kanüle zur Verbindung an i.c.v.-Katheter. **2), 4), 7)** 0,5 μ l Luft. **3)** 1 μ l ANG II-Lösung. **5)** 2,5 μ l physiologische Kochsalzlösung (NaCl). **6)** Polypropylen-schlauch. **8)** physiologische Kochsalzlösung (NaCl).

Das Injektionssystem wurde mithilfe der angebrachten präparierten Kanüle an die i.c.v.-Kanüle des Versuchstieres angeschlossen. Es wurde ein Gesamt-Injektionsvolumen von 5 μ l verabreicht, wobei eine Injektionsdauer von 10 sek. nicht unterschritten werden durfte, um ein Anschwellen des Gehirns vorzubeugen. Das Verschwinden der letzten Luftblase im Verbindungsschlauch kennzeichnete hierbei die erfolgreiche und vor allem vollständige Injektion der Substanz in den linken Seitenventrikel.

2.5 Bestimmung der aufgenommenen Trinkmenge

Die Trinkmenge wurde anhand einer Gewichts Differenzmessung bestimmt. Hierzu wurden kleine Metallbecher als Trinkgefäße genutzt, welche über einen Haken am Käfigrand befestigt und mit einem Klebestreifen gesichert wurden. Die Becher wurden darüber hinaus nummeriert um eine Verwechslung auszuschließen. Die Trinkgefäße wurden unmittelbar vor Beginn der Versuchsreihe gespült, mit Leitungswasser gefüllt und gewogen. Nach der i.c.v.-Injektion des ANG II wurden die Messbecher in den Käfig gehängt und verblieben dort für 20 Minuten. Nach Ablauf der 20 Minuten wurden diese Gefäße erneut gewogen und anhand der Differenz die Trinkmenge in g bzw. ml bestimmt.

2.6 Versuchsdurchführung

Es wurden zunächst die i.c.v.-Kanüle und der venöse Katheter implantiert. Nach der postoperativen Erholungsphase, in der der venöse Katheter regelmäßig gespült wurde, begann die Messung der basalen Trinkantwort. Hierzu wurde den Tieren 100 ng ANG II i.c.v. injiziert und die daraufhin gemessene Trinkantwort bestimmt. Bei einer Trinkantwort von weniger als 5 ml und mehr 20 ml wurden die Tiere von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Andernfalls konnte von einer korrekten Lage des Katheters ausgegangen werden.

2.6.1 Effekt von intravenös applizierten AT_1 -Rezeptorantagonisten auf die ANG II- induzierte Trinkantwort

Versuchsprotokoll 1:

Gruppe 1 (n* = 20)	Vehikel
Gruppe 2 (n = 10)	Candesartan (0,33 mg/kg)
Gruppe 3 (n = 17)	Telmisartan (1 mg/kg)
Gruppe 4 (n = 6)	Irbesartan (30 mg/kg)
Gruppe 5 (n = 6)	Losartan (10 mg/kg)

*n = Anzahl der Versuchstiere

Zunächst wurde die basale Trinkantwort gemessen und am Folgetag der AT_1 -Rezeptorantagonist oder das Vehikel intravenös verabreicht. Eine halbe Stunde und vier Stunden nach Applikation wurde die durch ANG II (100 ng) induzierte Trinkantwort erneut gemessen.

Behandlungsprotokoll:

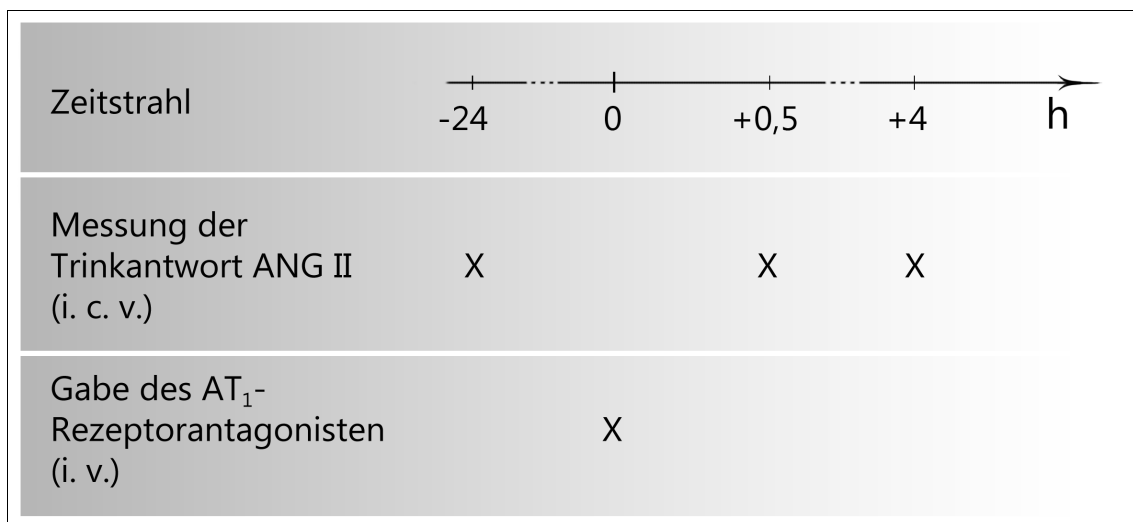


Abb. 3: Behandlungsprotokoll anhand eines Zeitstrahles mit basaler Messung, ohne Vorbehandlung mit Verapamil.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.6.2 *Effekt von intravenös applizierten AT₁-Rezeptorantagonisten auf die ANG II- induzierte Trinkantwort bei Hemmung von P-Glykoprotein durch Gabe von Verapamil*

Versuchsprotokoll 2:

Gruppe 1 (n* = 20)	Vehikel + Verapamil (10 mg/kg)
Gruppe 2 (n = 10)	Candesartan (0,33 mg/kg) + Verapamil (10 mg/kg)
Gruppe 3 (n = 17)	Telmisartan (1 mg/kg) + Verapamil (10 mg/kg)
Gruppe 4 (n = 6)	Irbesartan (30 mg/kg) + Verapamil (10 mg/kg)
Gruppe 5 (n = 6)	Losartan (10 mg/kg) + Verapamil (10 mg/kg)

*n = Anzahl der Versuchstiere

Eine Stunde vor der venösen Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten wurde der Pgp-Inhibitor Verapamil intraperitoneal verabreicht. Hier erfolgte ebenfalls eine halbe und vier Stunden nach Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten die Messung der Trinkantwort nach i.c.v.-Injektion von ANG II (100 ng).

Behandlungsprotokoll:

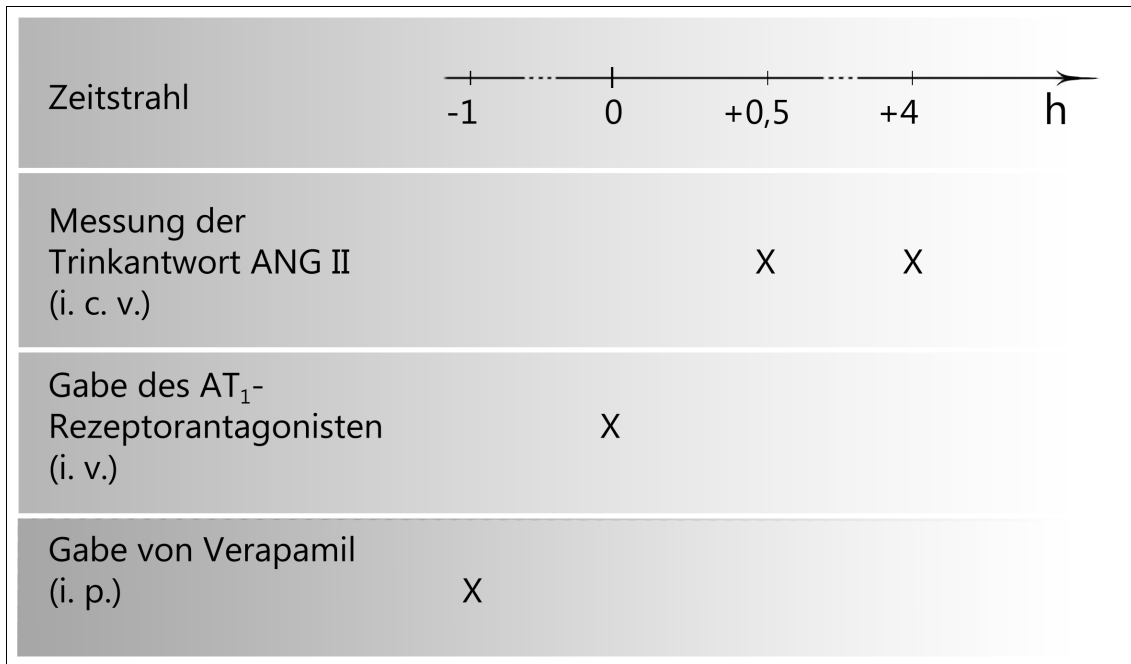


Abb. 4: Behandlungsprotokoll anhand eines Zeitstrahles, ohne basale Messung, mit Verapamil-Vorbehandlung.

2.7 „Neuetablierung“ der angewandten Methode

Im Folgenden wird auf die Schwierigkeiten der angewandten Narkose- und Operationsverfahren sowie deren Lösung eingegangen.

2.7.1 Narkoseverfahren mit Ketamin und Medetomidin

Aufgrund der geringen analgetischen Wirkung des Hypnotikums Chloralhydrat wurde primär die Einführung eines neuen Narkoseverfahrens mittels Ketamin und Medetomidin in Kombination erwogen. Hierzu wurde eine 10%ige Ketaminlösung zusammen mit Medetomidin mit Hilfe einer Mischspritze i.p. verabreicht. Die Dosierung betrug 60 mg/kg KG für Ketamin und 0,5 mg/kg KG für Medetomidin. Dies sollte eine gesicherte Analgesie und Anästhesie für mindestens 3 Stunden bieten. Bei nachlassender Wirkung wäre eine Folgedosis von einem Drittel der Primärdosis zu applizieren. Es zeigte sich allerdings, dass die Anästhesiezeit meist nur

20 bis 30 min betrug, bei kaum vorhandener Analgesie. Ein Nachspritzen der beschriebenen Folgedosis führte dagegen in aller Regel zum Tod des Versuchstieres. Diese Beobachtungen der genannten Schwierigkeiten wurden in mehreren Arbeitsgruppen festgestellt. Darüber hinaus bewirkt Medetomidin eine verstärkte Diurese, was hinsichtlich der später untersuchten Trinkantwort unter Umständen zu Verfälschungen der Messungen hätte führen können (Burton et al., 1998). Aufgrund der hohen Ausfallraten, der kurzen Anästhesiezeit und der möglichen Auswirkungen auf die späteren Versuchsreihen wurde in Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten das bewährte Hypnotikum Chloralhydrat genutzt, unter welchem keine der genannten Probleme auftraten. Die Lösung dieser Schwierigkeiten verzögerte den Beginn der Versuchsreihe um mindestens zwei Monate.

2.7.2 Postoperative Verhaltensauffälligkeiten und Sterblichkeit

Die Versuchstiere zeigten in manchen Fällen schon unmittelbar nach der Operation starke Abnormitäten, im Sinne von lethargischem Verhalten, fehlender Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme und ausbleibender Fellpflege. Diese mündeten später in weiteren körperlichen Reaktionen, wie geröteten Augen, apathischem Verhalten und Krampfanfällen. Die Entwicklung der genannten Symptome verlief völlig irregulär, weshalb zunächst von einer regulären Ausfallrate ausgegangen und die Versuche mit augenscheinlich gesunden Tieren begonnen wurden. Aber auch diese Tiere entwickelten im Laufe der Versuche die genannten Symptome. Nahezu alle Tiere verendeten oder mussten vor dem Ende der Versuchsreihe getötet werden, da ein weiteres Leiden der Versuchstiere ethisch nicht vertretbar gewesen wäre. Im Laufe der nun folgenden Fehlersuche wurden zunächst alle Medikamente neu angesetzt. Im Folgenden wurde die Lage der i.c.v.-Kanüle der entnommenen Gehirne kontrolliert, wobei auffiel, dass die Gehirne vor allem im Bereich der Oberfläche ungewöhnlich stark perfundiert waren und teilweise Eitereinschlüsse aufwiesen. Daraufhin wurde das entnommene Gewebe durch das Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover untersucht und eine hochgradige, eitrige Leptomeningitis und Enzephalitis nachgewiesen. Der ursächliche Erreger, *Escherichia coli*., wurde in einer zweiten Untersuchung vom Charles River Research Animal Diagnostic Services (MA, USA) bestätigt. Eine rigorose Neuausrichtung der Antisepsis, sowohl hinsichtlich des Operators, als auch des Operationsbesteckes und der Fremdmateriali-

en, führte letztlich zu einer erfolgreichen Verringerung der Ausfallrate, welche letztendlich bei nur noch 1-2 % lag.

Fehlersuche, Neuausrichtung und nicht zuletzt der erneute Tierversuchantrag führten zu einem verzögerten Beginn der Versuchsreihe, da alle bis dato erhobenen Messungen nicht verwertbar waren. Die ersten korrekten Messungen konnten etwa sechs Monate später vorgenommen werden.

2.8 Statistische Analyse

Die dargestellten Ergebnisse und Graphen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) aufgetragen. Die Auswertung der durch i.c.v.-Injektion von ANG II induzierten Trinkantwort erfolgte mittels einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen, gefolgt von einem post-hoc Test (Tukey). Diese Analyse wurde unter Verwendung der SYSTAT Software durchgeführt. Hierbei wurde ein paarweiser t-Test genutzt, um die Wahrscheinlichkeit eines Typ-1-Fehlers zu reduzieren (Ludbrook, 1994). Dabei wurde nicht nur ein Vergleich zwischen der basalen Trinkantwort und der Trinkantwort nach Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten durchgeführt, sondern ebenso bei zusätzlicher Vorbehandlung mit Verapamil. Das Signifikanzniveau betrug $P < 0,05$.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Resultate der Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten (i.v.) bzw. des Vehikels (i.v.) im Bezug auf die ANG II (i.c.v.)-induzierte Trinkantwort abhängig von einer zusätzlichen Verapamil-Vorbehandlung dargestellt.

3.1 Effekte des Vehikels (i.v.) auf die Trinkantwort

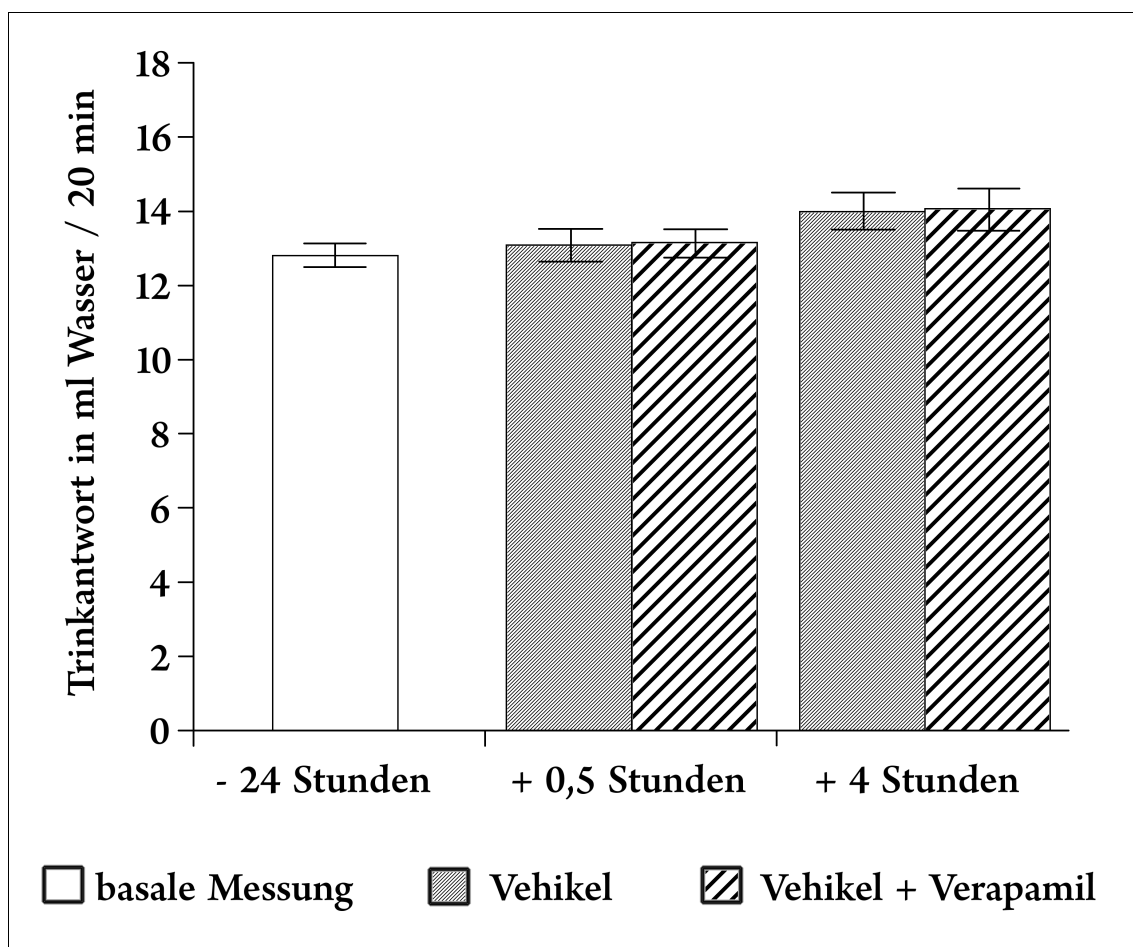


Abb. 1: Einfluss von intraperitoneal verabreichtem Verapamil auf die Trinkmenge (ml), 20 min nach i.c.v.-Injektion von ANG II (100 ng). Die Trinkmenge wurden einen Tag vor (basale Messung) und 0,5 und 4 Stunden nach Gabe des Vehikels gemessen.

Das i.c.v.-injizierte ANG II (100 ng) bewirkte eine Trinkantwort von 12-15 ml über 20 Minuten. Die basale Trinkantwort war in allen Gruppen ähnlich.

Es kam weder bei der Vehikel-Gabe noch bei der Vehikel + Verpamil-Gabe zu einer erhöhten oder verringerten Trinkantwort. Dies war sowohl nach einer halben Stunde als auch nach vier Stunden zu beobachten.

3.2 Effekte von Candesartan (i.v.) auf die Trinkantwort

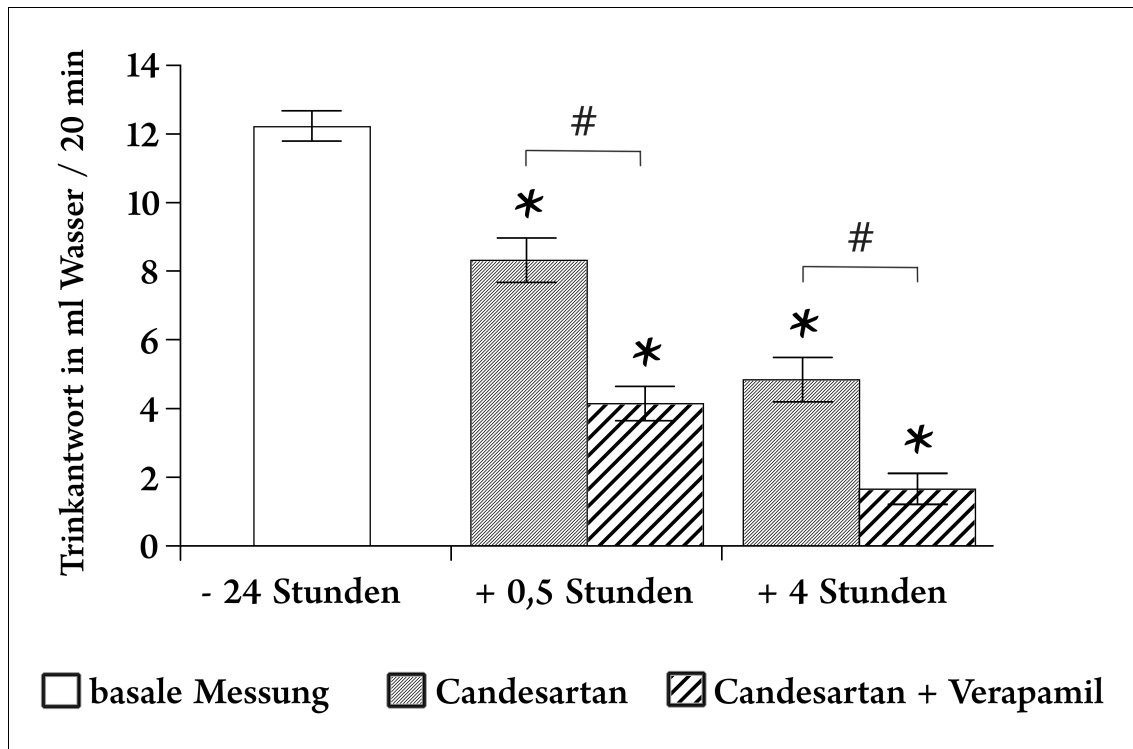


Abb. 5: Einfluss von intravenös verabreichtem Candesartan (0,33 mg/kg KG) allein und nach akuter Vorbehandlung mit Verapamil (eine Stunde vor AT_1 -Rezeptorantagonist-Gabe) auf die Trinkmenge (ml), 20 min nach i.c.v.-Injektion von ANG II (100 ng). Die Trinkmenge wurden einen Tag vor (basale Messung) und 0,5 und 4 Stunden nach Gabe des AT_1 -Rezeptorantagonisten gemessen. # $p > 0,05$ vs. Candesartan; * $p > 0,05$ vs. basal

Nach der Gabe von Candesartan kam es zu einer ca. 30%igen Abnahme der Trinkantwort nach 30 Minuten und einer 60%igen Abnahme der Trinkantwort nach 4 Stunden. Die Verringerung der Trinkantwort wurde durch die zusätzliche Gabe von Verapamil sowohl nach 30 Minuten als auch nach 4 Stunden signifikant verstärkt.

3.3 Effekte von Telmisartan (i.v.) auf die Trinkantwort

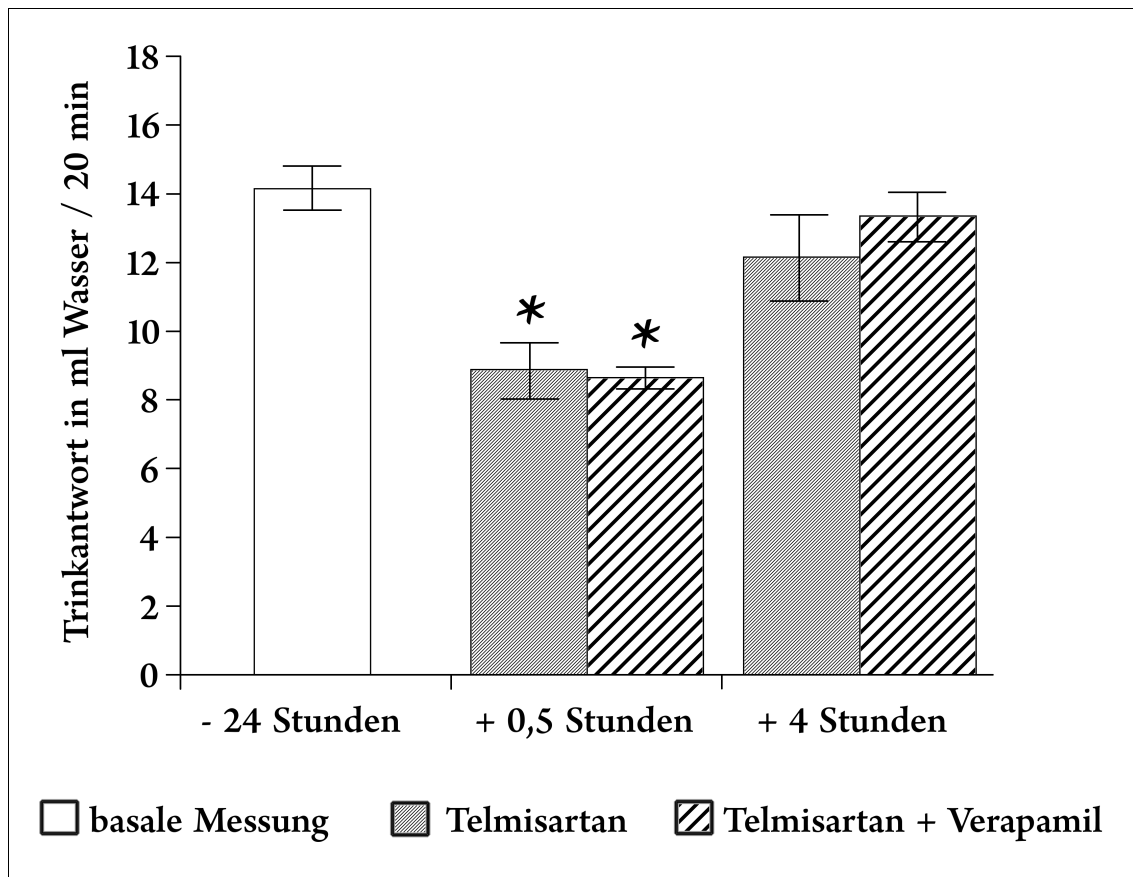


Abb. 6: Einfluss von intravenös verabreichtem Telmisartan (1 mg/kg KG) allein und nach akuter Vorbehandlung mit Verapamil (eine Stunde vor AT_1 -Rezeptorantagonist-Gabe) auf die Trinkmenge (ml), 20 min nach i.c.v.-Injektion von ANG II (100 ng). Es wurde sowohl 24 Stunden vor als auch 0,5 und 4 Stunden nach Gabe des AT_1 -Rezeptorantagonisten die Trinkantwort bestimmt. * $p > 0,05$ vs. basal

Die Gabe von Telmisartan führte zu einer deutlich reduzierten Trinkantwort nach 30 Minuten. Dieser Effekt war nach 4 Stunden allerdings wieder vollständig aufgehoben. Die zusätzliche Gabe von Verapamil hatte weder nach 30 Minuten noch nach 4 Stunden Auswirkungen auf die gemessene Trinkantwort.

3.4 Effekte von Losartan (i.v.) auf die Trinkantwort

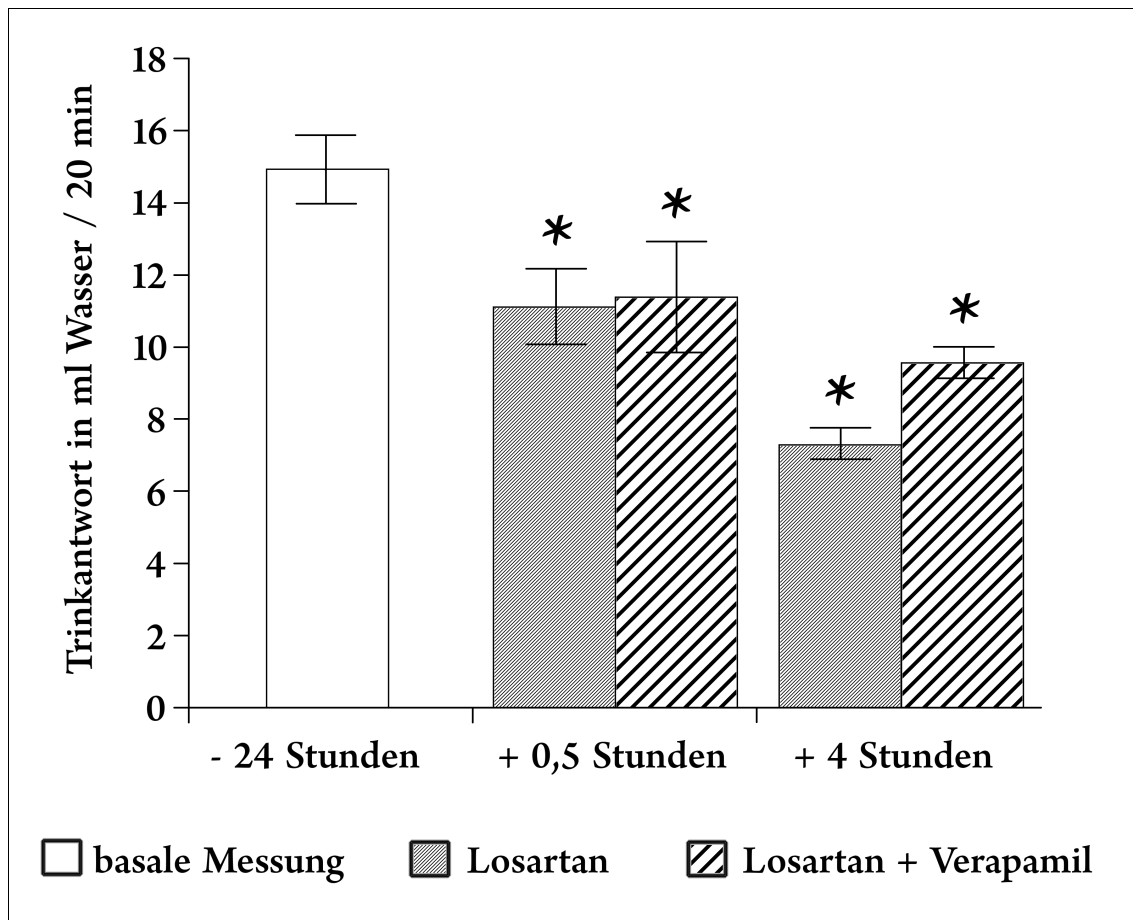


Abb. 7: Einfluss von intravenös verabreichtem Losartan (10 mg/kg KG) allein und nach akuter Vorbehandlung mit Verapamil (eine Stunde vor AT_1 -Rezeptorantagonist-Gabe) auf die Trinkmenge (ml), 20 min nach i.c.v.-Injektion von ANG II (100 ng). Es wurde sowohl 24 Stunden vor als auch 0,5 und 4 Stunden nach Gabe des AT_1 -Rezeptorantagonisten die Trinkantwort bestimmt. * $p < 0,05$ vs. basal

Die Gabe von Losartan führte zu einer verringerten Trinkantwort sowohl nach 30 Minuten als auch nach 4 Stunden. Die zusätzliche Gabe von Verapamil führte lediglich nach 4 Stunden zu einer geringfügig aber nicht signifikant erhöhten Trinkantwort.

3.5 Effekte von Irbesartan (i.v.) auf die Trinkantwort

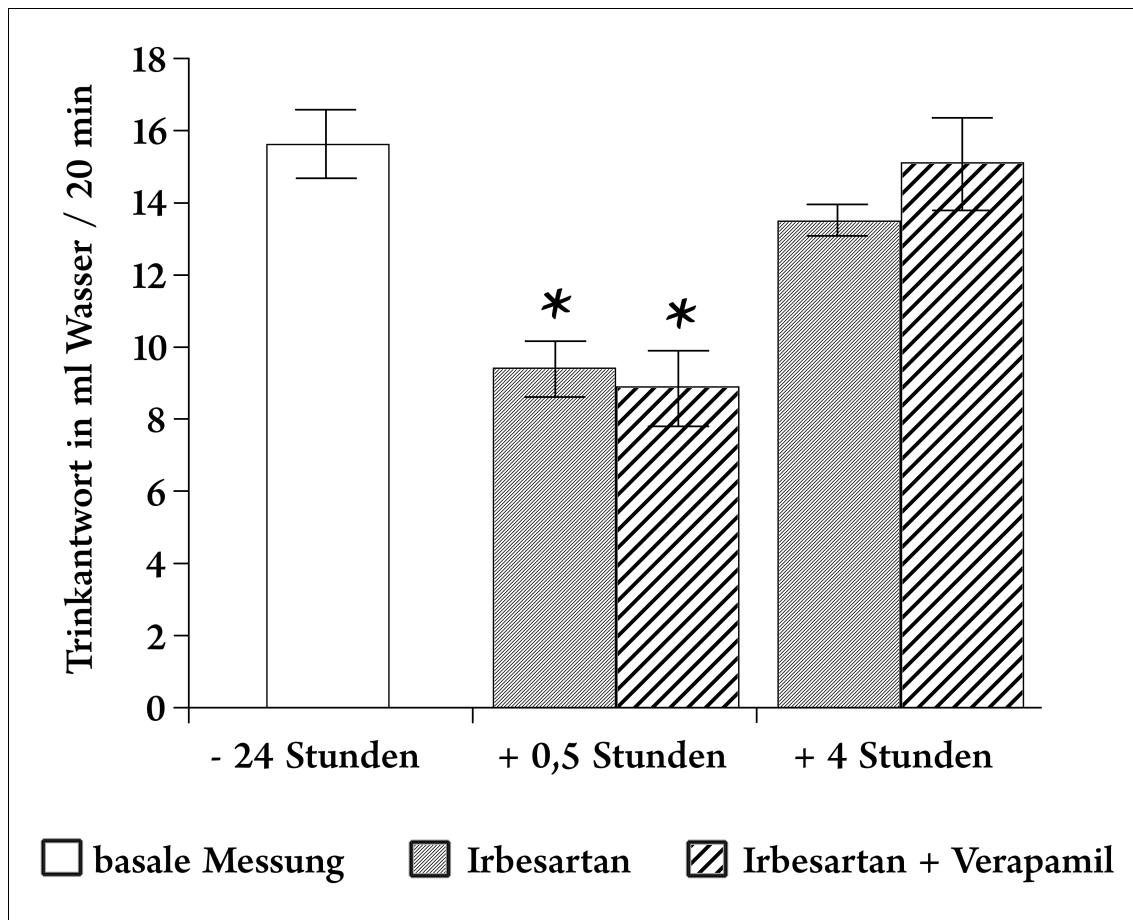


Abb. 8: Einfluss von intravenös verabreichtem Irbesartan (30 mg/kg KG) allein und nach akuter Vorbehandlung mit Verapamil (eine Stunde vor AT_1 -Rezeptorantagonist-Gabe) auf die Trinkmenge (ml), 20 min nach i.c.v.-Injektion von ANG II (100 ng). Es wurde sowohl 24 Stunden vor als auch 0,5 und 4 Stunden nach Gabe des AT_1 -Rezeptorantagonisten die Trinkantwort bestimmt. * $p < 0,05$ vs. basal

Die Gabe von Irbesartan führte zu einer signifikanten Verringerung der Trinkantwort nach 30 Minuten. Dieser Effekt war nach 4 Stunden nahezu aufgehoben. Die zusätzliche Gabe von Verapamil hatte keinen Einfluss auf die aufgenommene Trinkmenge.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit bzw. deren Ergebnisse zeigen, dass der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan nach i.v. Gabe, die durch i.c.v.-Applikation induzierte Trinkantwort deutlich effektiver und potenter inhibiert als Losartan und Irbesartan. Diese Hemmung wird zudem schon bei einer deutlich geringeren Dosierung erreicht, die im Gegensatz zu 10 mg/kg bei Losartan und 30 mg/kg bei Irbesartan lediglich 0,33 mg/kg bei Candesartan beträgt. Diese deutlich höhere Penetrationsfähigkeit von Candesartan in das ZNS lässt sich nicht anhand der lipophilen und hydrophilen Eigenschaften erklären, da Candesartan deutlich hydrophiler als Losartan und Irbesartan ist.

Die höhere Penetrationsfähigkeit des Candesartans im Vergleich zu Irbesartan, Losartan und Telmisartan könnte somit auf das Vorhandensein eines Efflux-Mechanismus hindeuten, welcher Irbesartan, Losartan und Telmisartan im Gegensatz zu Candesartan aus dem ZNS heraustransportiert.

Tabelle 2: AT₁-Rezeptorantagonisten und Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient log D bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 samt der jeweilige Affinitäten zum AT₁-Rezeptor (K_i); *EXP3174 ist der aktive Metabolit des Losartans ^x

AT ₁ -Rezeptorantagonist	Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient (log D)	Affinität (K _i) [nM]
EXP3174*	-1,6	3,7
Candesartan	-1,35	1
Losartan	1,16	3,7
Irbesartan	1,28	1,3
Telmisartan	1,9	3,7

^x(Tosco et al., 2008; Morsing et al., 1999; Scholze, 1999, Bakheit et al., 2015).

4.1 Losartan

Losartan wurde als Substrat des Pgp's beschrieben, allerdings konnte für den aktiven Metaboliten EXP 3174 kein gerichteter Transport entlang des Pgp's festgestellt werden. Dies könnte auf die Präferenz des Pgp's für kationische bis neutrale Substrate zurückgeführt werden, da EXP 3174 als Carbonsäure in wässriger Lösung eine anionische Ladung erlangt (Soldner et al., 2000).

Das intravenös verabreichte Losartan wird allerdings hepatisch metabolisiert (Erdmann, 2011). Daher führt eine Hemmung des Effluxtransporters Pgp möglicherweise zu einer erhöhten Konzentration des Losartans im ZNS, nicht aber zu einer höheren Konzentration seines aktiven Metaboliten EXP3174. Dies konnte durch die Versuche dieser Arbeit bestätigt werden. So zeigte sich nach Gabe von Losartan auch durch Inhibition des Pgp's keine Änderung der Trinkantwort. Hiernach liegt der Schluss nahe, dass Losartan und vor allem aber sein aktiver Metabolit kein Substrat des Pgp's zu sein scheint.

Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass Verapamil nicht nur als Inhibitor des Pgp's fungiert, sondern gleichzeitig das Cytochrom P450 Enzym CYP3A4 inhibiert, welches neben CYP2C9 für die Umwandlung von Losartan in seinen aktiven Metaboliten EXP 3174 verantwortlich ist (Kolars et al., 1994). Somit steht dem Organismus unter Verapamil-Vorbehandlung eine geringere Konzentration des aktiven Metaboliten zur Verfügung.

Es zeigte sich, dass die Reduzierung der Trinkantwort nach 4 Stunden stärker ausfiel als eine halbe Stunde nach Losartan-Gabe. Dies lässt sich auf den oben genannten Metabolismus zurückführen, welcher in der Lage ist 4 Stunden nach Applikation des Losartans deutlich höhere Konzentrationen des aktiven Metaboliten EXP 3174 bereitzustellen. Die zusätzliche Gabe des Pgp-Inhibitors Verapamil führte allerdings weder nach einer halben noch nach 4 Stunden zu einer verstärkten Trinkantwort. Nach 4 Stunden war ein leichter Anstieg der Trinkantwort im Vergleich zur alleinigen Losartan-Applikation zu beobachten, der sich durch die unterdrückte Bildung des aktiven Metaboliten erklären lässt. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Einfluss des Verapamils in der verabreichten Dosierung für die Pharmakokinetik des Losartans und seines Metaboliten EXP 3174 vernachlässigbar ist.

4.2 Telmisartan und Irbesartan

Es konnte gezeigt werden, dass Telmisartan als Inhibitor des Pgp's in der Lage ist den transmembranären Transport von Digoxin an Kolon-Adenokarzinom-Zelllinien und Caco-2-Zellen suffizient zu hemmen (Kamiyama et al., 2010).

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass der Auswärtstransport fluoreszierenden Calceins an Pgp-exprimierenden Zelllinien durch Telmisartan und in deutlich geringerem Maße durch Irbesartan signifikant reduziert wurde (Weiss et al., 2010). Diese Ergebnisse konnten allerdings nur an einer Mäusezelllinie P388/dx festgestellt werden. An einer Schweinenieren-Zelllinie, welche menschliches Pgp überexprimiert, konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen ebenfalls den oben genannten *in-vitro*-Ergebnissen an der Mäusezelllinie und decken sich mit den Ergebnissen an der Schweinenieren-Zelllinie. Es stellte sich heraus, dass es weder bei Telmisartan noch bei Irbesartan zu einer reduzierten Trinkantwort nach Hemmung des Pgp's mittels Verapamil kam. Diese Studie zeigte darüber hinaus, dass die hemmende Wirkung des Telmisartans der des Verapamils sogar noch überlegen ist. Daher besteht durchaus die Möglichkeit, dass das Telmisartan selbst bereits als starker Inhibitor des Pgp's wirkt und eine zusätzliche Gabe des Verapamils keine Änderung der Permeabilität mehr zulässt. Des weiteren ist es möglich, dass die passive Auswärtsdiffusion von Telmisartan und Irbesartan den Effekt des Pgp-Transporters überlagern kann.

Darauf aufbauend haben Folgestudien von Saaby et al. diesen Ansatz aufgegriffen und versucht mit Hilfe von Telmisartan den Auswärtstransport Verapamils zu hemmen, um auf diese Weise eine höhere Konzentration im ZNS zu erreichen. Dieser Ansatz findet Anwendung in der Behandlung des Cluster-Kopfschmerzes (Saaby et al., 2015). Hierbei konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss des Telmisartans auf das Pgp festgestellt werden.

Die widersprüchlichen Ergebnisse dieser Studie zu den vorherigen Studien und die verschiedenen Ergebnisse in unterschiedlichen Zelllinien legen daher den Schluss nahe, dass andere Transporter als das Pgp für den transmembranären Transport des Telmisartans als auch des Irbesartans verantwortlich sind. Hierbei kämen andere ABC-Transporter oder weniger gut beschriebene Transporter in Frage.

4.3 Candesartan

Die Erkenntnisse vorheriger Studien legten den Verdacht nahe, dass Candesartan nicht von Pgp transportiert werden könnte (Takara et al., 2002; Kamiyama et al., 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Candesartan selbst in deutlich geringerer Dosierung als alle anderen untersuchten AT₁-Rezeptorantagonisten in der Lage ist die Trinkantwort deutlich zu reduzieren. Dies könnte zum einen auf die sehr hohe Affinität (siehe Tabelle 1) und Spezifität des Candesartans zum AT₁-Rezeptor zurückzuführen sein, welche im Gegensatz zu beispielsweise Losartan einer nicht-überwindbaren Bindung entspricht und somit auch bei hohen ANG-II-Konzentrationen als nahezu unüberwindlicher Antagonist wirkt (Dominiak und Heusch, 1999), zum anderen aber auch auf die mögliche höhere Permeabilität aufgrund des nicht vorhandenen Effluxtransportes über das Pgp.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie widersprechen dieser Vermutung, da es unter der Inhibition des Pgp's mittels Verapamil zu einer signifikanten Verringerung der Trinkantwort um ca. 50 % im Vergleich zur Gabe von Candesartan ohne Verapamil kam.

Einige *In-vitro*-Studien an Caco-2-Zellen, in Anwesenheit von Verapamil und Cyclosporin A als potente Pgp-Inhibitoren, führten ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Permeabilität für Candesartan von apikal nach basolateral (Zhou et al., 2009) und stützen somit die Ergebnisse dieser Studie.

Es ist allerdings aufgrund der geringen Rezeptorspezifität des Verapamils hinsichtlich des Pgp's möglich, dass die beschriebene Verringerung der Trinkantwort unter Verapamil-Gabe auf eine zusätzliche Hemmung weiterer Transporter zurückzuführen ist.

4.4 P-Glykoprotein-Inhibitor: Verapamil

Verapamil stellt nicht nur einen Inhibitor des Pgp's dar sondern ist darüber hinaus selbst ein Substrat des Pgp's (Hsiao et al., 2006) und ein sogenannter „first generation“-Inhibitor (Palmeira et al., 2012). Diese Inhibitoren gelten als kompetitive Hemmstoffe, die als Substrat zwar das Pgp hemmen, jedoch den Katalysezyklus selbst nicht unterbinden, da sie nicht an der ATP-Bindungsstelle des Pgp's binden. Ferner ist Verapamil als Inhibitor weiterer Transporter beschrieben worden (Ambudkar et al., 1999).

Die Spezifität der Inhibition, bezogen auf das Pgp, ist allerdings gering. So hemmt Verapamil

beispielsweise nicht nur das Pgp sondern auch das CYP3A4-Enzym und setzt somit parallel an mehreren Mechanismen des Arzneimittelmetabolismus an, was die Aussagekraft der Ergebnisse schwächt (Wandel et al., 1999).

Auch neuere Pgp-Inhibitoren der zweiten, wie z.B. Dexverapamil, das rechtsdrehende Enantiomer des Verapamils, oder dritten Generation, wie beispielsweise Tariquidar, besitzen zwar eine deutlich höhere Selektivität, konnten allerdings als therapeutisches Mittel, in der ursprünglichen Verwendung als Wirkungsverstärker der antikanzerogenen Therapie, nicht überzeugen (Palmeira et al., 2012).

4.5 P-Glykoprotein

Es konnte gezeigt werden, dass Candesartan, Irbesartan und Telmisartan in der Lage sind, den Transport von Digoxin über Pgp an Caco-2-Zellen zu hemmen (Kamiyama et al., 2010).

Es existieren momentan zwei Modelle der Arbeitsweise des Pgp's. Zum einen die von Loo und Clarke (1999) postulierte Arbeitsweise, nach welcher das Substrat aufgrund seiner Lipophilie in den Lipid-Bilayer der Plasmamembran aufgenommen wird und mittels Diffusion zum Pgp gelangt. Das Pgp dient somit als „hydrophober Staubsauger“, welcher die verschiedenen lipophilen Substanzen schon vor bzw. während des Durchdringens der Zellmembran abfängt und wieder heraustransportiert. Hierbei kommt es unter Verbrauch von ATP nach der Bindung an die Substratbindungsstelle, eine lipophile Tasche des Pgp's, zu einer Konformitätsänderung, welche letztlich zum Auswärtstransport der jeweiligen Substanz führt.

Zum anderen wird eine Arbeitsweise postuliert, nach der das Pgp als „Flippase“ fungiert und die Substanzen an der inneren Hälfte der Zytoplasmamembran bindet, um sie zur äußeren Seite der Membran zu transportieren und sie so direkt in den Extrazellularraum zu entlassen. Dieses Modell wird gestützt durch die Erkenntnis, dass das MDR2-Genprodukt, einem dem Pgp sehr ähnlichen Transporter, an der hepatischen Plasmamembran als Phosphatidylcholine-Translocase fungiert und somit ebenfalls als „Flippase“ Phosphatidylcholine in die Galle transportiert (Zhou et al., 1999).

Es ist darauf hinzuweisen, dass die Bindungsstelle am Pgp sich von Substrat zu Substrat unterscheidet. So bindet Verapamil bevorzugt an der H-Seite des Pgp's, während z.B. Daunorubicin an der R-Seite bindet. Dies hat zur Folge, dass die Gabe von Daunorubicin erst dann eine

Verringerung der Verapamil-Permeabilität induziert, wenn die Konzentration soweit erhöht wurde, bis Daunorubicin ebenfalls an der H-Seite des Pgp's bindet. Die Bezeichnungen „R“ und „H“ gehen zurück auf die ersten beschriebenen selektiven Substrate Rhodamine 123 und Hoechst 33342, welche jeweils die beschriebenen spezifischen Bindungsstellen nutzen, wobei eine Bindung an der konträren Bindungsstelle erstaunlicherweise zu einer Erhöhung der Transportrate an der jeweiligen Bindungsstelle führte (Shapiro und Ling, 1998). Darüber hinaus ist die M-Seite (die Modulator-bindende Seite) beschrieben, welche zentral gelegen, in der Lage ist beide Bindungsstellen zu beeinflussen (Rautio, 2006). Es stellt sich somit die Frage, ob Candesartan ebenfalls an der H-Seite des Pgp's bindet und somit von Verapamil erfolgreich verdrängt wird, wohingegen Telmisartan, Irbesartan und Losartan vornehmlich an die R-Seite binden und somit vom Verapamil nicht verdrängt werden. Aufgrund der noch nicht nachvollziehbaren Substanzfavorisierung für die R- bzw. H-Seite und der Wechselwirkungen ist dies jedoch Bestandteil zukünftiger Forschungsansätze.

4.6 Methodenkritik

Die geringe Rezeptorspezifität des Verapamils ist als Kritikpunkt hervorzuheben, da eine Hemmung weiterer Transporter an der Blut-Hirn-Schranke nicht auszuschließen ist und die Inhibition der CYP3A4-Enzymaktivität ebenfalls Auswirkungen auf die Messungen haben könnte. Eine Hemmung mittels Pgp-Inhibitoren zweiter oder dritter Generation, welche das Pgp selektiver hemmen, wären als Alternative für spätere Studien zu nennen. Im Rahmen dieser Studie wurde auf die Verwendung dieser Substanzen verzichtet, da eine hinreichende Hemmung des Pgp's sichergestellt war.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan, Telmisartan, Irbesartan und Losartan hinsichtlich ihrer jeweiligen Penetrationsfähigkeit vergleichend untersucht. Die Erkenntnis mehrerer Studien über die neuroprotektive Wirkung einiger AT₁-Rezeptorantagonisten, vor allem von Candesartan, bei zeitnaher Gabe vor oder nach einer fokalen zerebralen Ischämie diente als Grundlage dieser Studie. Die unterschiedliche Penetrationsfähigkeit der AT₁-Rezeptorantagonisten durch die Blut-Hirn-Schranke führte zu der Frage nach der möglichen Bedeutung des Multi-Drug-Transporters P-Glykoprotein und wurde in dieser Arbeit näher erforscht. Hierzu wurde der P-Glykoprotein-Inhibitor Verapamil verabreicht. Als Messparameter diente in allen Versuchsreihen die durch Angiotensin II-Gabe induzierte zentral vermittelte Trinkantwort.

Die Versuche erfolgten an normotensiven, wachen Ratten, denen zuvor eine Kanüle in den rechten Seitenventrikel und ein Katheter in die Vena femoralis implantiert wurde. Die AT₁-Rezeptorantagonisten wurden intravenös verabreicht. Die gewählten Dosierungen betrugen für Candesartan 0,33 mg/kg KG, für Telmisartan 1 mg/kg KG, für Irbesartan 10 mg/kg KG und für Losartan 30 mg/kg KG. Eine halbe Stunde und vier Stunden nach intravenöser Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten erfolgte die Messung der Trinkantwort auf intracerebroventrikulär appliziertes Angiotensin II (100 ng). Im zweiten Teil der Versuchsanordnung wurde der beschriebene Versuchsablauf im Wesentlichen wiederholt, mit der Abweichung, dass eine halbe Stunde vor Gabe der AT₁-Rezeptorantagonisten Verapamil in einer Dosierung von 10 mg/kg KG intraperitoneal appliziert wurde.

Die Gabe aller genannten AT₁-Rezeptorantagonisten führte zu einer Verringerung der Trinkantwort. Unterschiede zeigten sich vor allem hinsichtlich der Dauer der Trinkantwortsuppression als auch der nötigen Dosierung. Hierbei stach vor allem Candesartan hervor, welches trotz geringster Dosierung und höchster Hydrophilie, und somit einer theoretisch geringen Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke, die potenteste und langfristige Hemmung aller untersuchten AT₁-Rezeptorantagonisten aufwies. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der deutlich höheren Affinität Candesartans zum AT₁-Rezeptor im Vergleich zu Losartan, Irbesartan und Telmisartan. Eine weitere Erklärung könnte in der stärkeren Permeabilität aufgrund

ZUSAMMENFASSUNG

eines fehlenden Auswärtstransportes über das P-Glykoprotein liegen. Im zweiten Teil der Studie wurde daher das P-Glykoprotein mittels Verapamil inhibiert. Es zeigte sich allerdings ein überraschendes Ergebnis. Die Trinkantwort nach Vorbehandlung mit Verapamil zeigte bei Candesartan eine signifikante Reduzierung der Trinkantwort. Die Vorbehandlung mit Verapamil bei Losartan, Irbesartan und Telmisartan führte zu keiner Änderung der Trinkantworten. Für diese Ergebnisse gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zum einen scheint Candesartan Substrat des P-Glykoproteins zu sein, zum anderen könnte ein möglicher Transport der anderen deutlich höher dosierten AT₁-Rezeptorantagonisten über das P-Glykoprotein durch die Diffusion entlang der Blut-Hirn-Schranke überlagert werden. Die Frage nach dem Einfluss des P-Glykoproteins auf den Transport der AT₁-Rezeptorantagonisten über die Blut-Hirn-Schranke ist somit noch nicht endgültig geklärt und wird weiterhin zu erforschen sein.

6 Literatur

Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361-398

Antonaccio, M. J. (1982): Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 57-87

Bakheit, A. H. H., Abd-Elgalil, A. A., Mustafa, B., Haque, A., Wani, T. A. (2015): Telmisartan. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 40, 371-429

Brdon, J., Kaiser, S., Hagemann, F., Zhao, Y., Culman, J., Gohlke, P. (2007): Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke. *J. Hypertens.* 25, 187-196

Brolund, L. (2008): Vergleichende Untersuchung der Penetration von AT1-Rezeptorantagonisten durch die Blut-Hirn-Schranke - Bedeutung von P-Glykoprotein. *Med. Diss., Kiel*

Burton, S., Lemke, K. A., Ihle, S. L., Mackenzie, A. L. (1998): Effects of medetomidine on serum osmolality; urine volume, osmolality and pH; free water clearance; and fractional clearance of sodium, chloride, potassium, and glucose in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 59, 756-761

Culman, J., Baulmann, J., Blume, A., Unger, T. (2001): The renin-angiotensin system in the brain: an update. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2, 96-102

Dai, W. J., Funk, A., Herdegen, T., Unger, T., Culman, J. (1999): Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke* 30, 2391-2398; discussion 2398-2399

- Davisson, R. L., Oliverio, M. I., Coffman, T. M., Sigmund, C. D. (2000):** Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J. Clin. Invest.* 106, 103-106
- De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., Unger, T. (2000):** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52, 415-72
- Devraj, K., Klinger, M. E., Myers, R. L., Mokashi, A., Hawkins, R. A., Simpson, I. A. (2011):** GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: differential phosphorylation. *J. Neurosci. Res.* 89, 1913-1925
- Dinh, D. T., Frauman, A. G., Johnston, C. I., Fabiani, M. E. (2001):** Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin. Sci.* 100, 481-492
- Dominiak, P., Heusch, G. (1999):** AT1-Rezeptorblockade. Steinkopff, Heidelberg/Darmstadt
- Dominiak P., Unger T. (1999):** AT1-Rezeptorantagonisten, Angiotensin II. Steinkopff, Heidelberg/Darmstadt
- Drion, N., Lemaire, M., Lefauconnier, J. M., Scherrmann, J. M. (1996):** Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J. Neurochem.* 67, 1688-1693
- Ehrlich P. (1885):** Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie, Hirschwald, Berlin
- Erdmann, E. (2011):** Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. Springer, Berlin

Fenart, L., Buée-Scherrer, V., Descamps, L., Duhem, C., Poullain, M. G., Cecchelli, R. (1998): Inhibition of P-glycoprotein: rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* 15, 993-1000

Föger, F. (2009): Strategies to overcome efflux pumps. In: Bernkop-Schnürch A.: Oral Delivery of Macromolecular Drugs, Springer US, New York, 123-136

Fox, A. J., Lalloo, U. G., Belvisi, M. G., Bernareggi, M., Chung, K. F., Barnes, P. J. (1996): Bradykinin-evoked sensitization of airway sensory nerves: a mechanism for ACE-inhibitor cough. *Nat. Med.* 2, 814-817

Gohlke, P., Kox, T., Jürgensen, T., von Kügelgen, S., Rascher, W., Unger, T. (2002): Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 365(6):477-83

Groth, W., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T., Culman, J. (2003): Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J. Hypertens.* 21, 2175-2182

Hsiao, P., Sasongko, L., Link, J. M., Mankoff, D. A., Muzi, M., Collier, A. C. (2006): Verapamil P-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration inhibition analysis, and comparison with human data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 704-710

Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terrón, J. A., Falcón-Neri, A., Saavedra, J. M. (2001): Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke* 33, 2297-2303

Juliano, R. L., Ling, V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455, 152-162

Kamiyama, E., Nakai, D., Mikkaichi, T., Okudaira, N., Okazaki, O. (2010): Interaction of angiotensin II type 1 receptor blockers with P-gp substrates in Caco-2 cells and hMDR1-expressing membranes. *Life Sci.* 86, 52-58

Kapadia, R., Yi, J-H, Vemuganti, R. (2008): Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front. Biosci.* 13, 1813-1826

Kaschina, E., Lauer, D., Schmerler, P., Unger, T., Steckelings, U. M. (2014): AT2 receptors targeting cardiac protection post-myocardial infarction. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 441

Kim, S., Iwao, H. (2000): Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* 52, 11-34

Klein, I., Sarkadi, B., Váradi, A. (1999): An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 237-262

Kolars, J. C., Lown, K. S., Schmiedlin-Ren, P., Ghosh, M., Fang, C., Wrighton, S. A. (1994): CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 4, 247-259

Loo, T. W., Clarke, D. M. (1999): Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemistry and Cell Biology* 77, 11-23

Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., Herdegen, T., Sievers, J., Unger, T. (1998): The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J. Exp. Med.* 188, 661-670

Ludbrook, J. (1994): Repeated measurements and multiple comparisons in cardiovascular research. *Cardiovasc. Res.* 28, 303-311

Lüllmann-Rauch, R. (2006): Histologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

McKinley, M. J., Albiston, A. L., Allen, A. M., Mathai, M. L., May, C. N., McAllen, R. M. (2003): The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 901-918

Morsing, P., Adler, G., Brandt-Eliasson, U., Karp, L., Ohlson, K., Renberg, L., Sjöquist, P. O., Abrahamsson, T. (1999): Mechanistic differences of various AT1-receptor blockers in isolated vessels of different origin. *Hypertension.* 33, 1406-13

Nishimura, Y., Ito, T., Saavedra, J. M. (2000): Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 31, 2478-2486

Ohshima, K., Mogi, M., Horiuchi, M. (2013): Therapeutic approach for neuronal disease by regulating renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rev* 9, 99-107

Ohtsuki, S. (2004): New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1489-1496

Oldendorf, W. H. (1974): Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147, 813-815

Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P. B., Ndebele K. (2014): The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflam* 2014, 689360

Page, I. H., Helmer, O. M. (1940): A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J. Exp. Med.* 71, 29-42

Palmeira, A., Sousa, E., Vasconcelos, M. H., Pinto, M. M. (2012): Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr. Med. Chem.* 19, 1946-2025

Pardridge, W. M. (1993): Brain drug delivery and blood-Brain barrier transport. *Drug Delivery* 1, 83-101

Paul, M., Poyan Mehr, A., Kreutz, R. (2006): Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86, 747-803

Paxinos, G., Watson, C. (1980): The rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*; 3:129-49

Pollay, M., Davson, H. (1963): The passage of certain substances out of the cerebrospinal fluid. *Brain* 86, 137-150

Rapoport, S. I. (1976): Blood-brain Barrier in Physiology and Medicine.
In: Raven Press, New York

Rautio, J. (2006): In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metabolism and Disposition* 34, 786-792

Reinecke, K., Lucius, R., Reinecke, A., Rickert, U., Herdegen, T., Unger, T. (2003): Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J.* 17, 2094-2096

Saaby, L., Tfelt-Hansen, P., Brodin, B. (2015): The putative P-gp inhibitor telmisartan does not affect the transcellular permeability and cellular uptake of the calcium channel antagonist verapamil in the P-glycoprotein expressing cell line MDCK II MDR1. *Pharmacology Research & Perspectives* Bd. 3, 2.

Schinkel, A. H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C. A., van Deemter, L., Smit, J. J. (1997): Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4028-4033

Schinkel, A. H., Smit, J. J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L. (1994): Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502

Scholze, J. (1999): Hypertonie: Risikokonstellationen & Begleiterkrankungen ; praxisnahe Diagnostik und Individualtherapie ; mit 208 Tabellen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Senbonmatsu, T., Saito, T., Landon, E. J., Watanabe, O., Price, E., Roberts, R. L. (2003): A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 22, 6471-6482

Shapiro, A. B., Ling, V. (1998): The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein. *Acta Physiol Scand Suppl* 643, 227-234

Skeggs, L. T., Marsh, W. H., Kahn, J. R., Shumway, N. P. (1954): The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med.* 99, 275-282

Soldner, A., Benet, L. Z., Mutschler, E., Christians, U. (2000): Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and Caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol* 129, 1235-1243

Stewart, P. A., Wiley, M. J. (1981): Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. In: Dev Biol 84, 183-192

Takara, K., Kakumoto, M., Tanigawara, Y., Funakoshi, J., Sakaeda, T., Okumura, K. (2002): Interaction of digoxin with antihypertensive drugs via MDR1. Life Sci. 70, 1491-1500

Taylor, J. C., Horvath, A. R., Higgins, C. F., Begley, G. S. (2001): The multidrug resistance P-glycoprotein. Oligomeric state and intramolecular interactions. J. Biol. Chem. 276, 36075-36078

Tosco, P., Rolando, B., Fruttero, R., Henchoz, Y., Martel, S., Carrupt, P.-A. (2008): Physicochemical profiling of sartans: A detailed study of ionization constants and distribution coefficients. HCA 91, 468-482

Tsutsumi, K., Saavedra, J. M. (1991): Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 261, R209-R216

Ueda, K., Clark, D. P., Chen, C. J., Roninson, I. B., Gottesman, M. M., Pastan, I (1987): The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. J. Biol. Chem. 262, 505-508

Vanderheyden, P. M., Fierens, F. L., Vauquelin, G. (2000): Angiotensin II type 1 receptor antagonists. Why do some of them produce insurmountable inhibition? Biochem Pharmacol. 60, 1557-1563

Van Liefde, I., Vauquelin, G. (2009): Sartan-AT₁ receptor interactions: in vitro evidence for insurmountable antagonism and inverse agonism. Mol. Cell. Endocrinol. 302, 237-243

Vauquelin, G., Fierens, F., Van Liefde, I. (2006): Long-lasting angiotensin type 1 receptor binding and protection by candesartan: comparison with other biphenyl-tetrazole sartans. *J Hypertens Suppl* 24, 23-30

Villapol, S., Balarezo, M. G., Affram, K., Saavedra, J. M., Symes, A. J. (2015): Neurorestoration after traumatic brain injury through angiotensin II receptor blockage. *Brain* 38, 3299-3315

Wandel, C., Kim, R. B., Kajiji, S., Guengerich, P., Wilkinson, G. R., Wood, A. J. (1999): P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res.* 59, 3944-3948

Weiss, J., Sauer, A., Divac, N., Herzog, M., Schwedhelm, E., Böger, R. H. (2010): Interaction of angiotensin receptor type 1 blockers with ATP-binding cassette transporters. *Biopharm Drug Dispos* 31, 150-161

Wolf, S.; Seehaus, B.; Minol, K.; Gassen, H.G., (1996): Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des zerebralen Mikrozirkulationssystem. *Naturwissenschaften* 83, 302-311

Zhou, L., Chen, X., Gu, Y. & Liang, J. (2009): Transport characteristics of candesartan in human intestinal Caco-2 cell line. *Biopharm Drug Dispos* 30, 259-264

Zhou, Y., Gottesman, M. M., Pastan, I. (1999): Studies of human MDR1-MDR2 chimeras demonstrate the functional exchangeability of a major transmembrane segment of the multi-drug transporter and phosphatidylcholine flippase. *Mol Cell Biol.* 19(2), 1450-1459

7 Danksagung

Diese Arbeit ist in den Jahren 2010-2015 am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entstanden.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die direkt oder indirekt an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben und somit maßgeblich am Gelingen beteiligt waren. Namentlich hervorheben möchte ich folgende Personen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. Cascorbi für die Überlassung des Themas. Vor allem danke ich Herrn Prof. Dr. sc. hum. Peter Gohlke, dem es nicht nur gelungen ist mein Interesse an der Thematik zu wecken sondern auch in schwierigen Phasen der Arbeit aufbauende Worte zu finden und gleichzeitig zielführend sein Wissen mit mir zu teilen. Außerdem danke ich Herrn PD Dr. med. Juraj Culman für die fachliche Unterstützung und die guten Ideen. Ein Dank gilt ebenfalls Herrn Jan Brdon, dessen Hilfsbereitschaft und technisches Können vor allem im Verlauf der experimentellen Phase der Arbeit unersetzlich war. Darüber hinaus danke ich den Tierpflegern und technischen Assistenten des Instituts.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir nicht nur dieses Studium ermöglicht hat, sondern darüber hinaus immer an mich geglaubt hat und daher nicht nur hinsichtlich dieser Arbeit unentbehrlich war und ist.

Ich danke meiner Freundin Liliya Tolstych, die dieser Arbeit durch unermüdliches Korrekturlesen und wunderbare Zeichnungen den letzten Schliff gegeben hat.

Zu guter Letzt danke ich meinem langjährigen Freund und Kommilitonen Toni Jacob für die tolle und angenehme Zusammenarbeit im Labor und vor allem für das gemeinsame Meistern vieler Widrigkeiten bei der Entstehung dieser Arbeit.

8 Lebenslauf

Name: Sven Ole Schuster
Geburtsdatum: 13.05.1988
Geburtsort: Thedinghausen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Mutter: Gudrun Schuster, geb. 16.06.1956
Beruf: Lehrerin
Vater: Bernd Schuster, geb. 01.10.1952
Beruf: Dipl.-Biologe

Berufstätigkeit

2009 – 2014 Studentische Hilfskraft am Physiologischen Institut der
Christian-Albrechts-Universität Kiel
seit 2014 Arzt beim Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes

Promotionsstudium

2010 Beginn der Dissertation am Institut für Experimentelle und Kli-
nische Pharmakologie unter Betreuung von Prof. Dr. sc. hum.
Peter Gohlke

Studium

2007 – 2009 Studium Medizin : Vorklinik: CAU Kiel
Abschluss: 1. Staatsexamen
2009 – 2013 Studium Medizin: Klinik: Uni-Klinik Kiel
Abschluss: 2. Staatsexamen
seit 2014 Promotionsstudium am Pharmakologischen Institut der Chris-
tian-Albrechts-Universität Kiel

Schul Ausbildung

1994 – 1998 Grundschule Haarentor Oldenburg
1998 – 2004 IGS Marschweg Oldenburg
2004 – 2007 Oberstufe: Helene-Lange-Schule Oldenburg
06.06.2007 Allgemeine Hochschulreife

9 Publikationen

Jacob, T., Schuster, S. O., Cascorbi, I., Culman, J., Fricker, G., Gohlke, P. (2012): Bedeutung der Transporterproteine MRP-2 und P-Glykoprotein für die Penetration von AT₁-Rezeptorantagonisten durch die Blut-Hirn-Schranke, 14. Bad Herrenalber Transporter- und Barriere-Tage, 14.-16. Mai 2012, Bad Herrenalb

Schuster, S. O., Jacob, T., Cascorbi, I., Culman, J., Fricker, G., Gohlke, P. (2013): Role of the transporter proteins MRP-2 and P-glycoprotein in the penetration of AT₁-receptor antagonists through the blood-brain barrier. Barriers of the CNS, 10.-13. Februar 2013, Costa Tegui-se, Lanzarote

Jacob, T., Schuster, S. O., Cascorbi, I., Culman, J., Fricker, G., Gohlke, P. (2014): Penetration of AT₁-receptor antagonists through the blood-brain barrier: Are transporter proteins such as MRP-2 and P-glycoprotein involved? 38. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. – Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention, 11.-13. Dezember 2014, Berlin

Jacob, T., Schuster, S. O., Cascorbi, I., Culman, J., Gohlke, P. (2015): Penetration of AT₁-receptor antagonists through the blood-brain barrier: Are transporter proteins such as MRP-2 and P-glycoprotein involved? Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 10.-12. März 2015, Kiel

Culman, J., Jacob, T., Schuster, S.O., Spaether, K., Brolund, L., Cascorbi, I., Zhao, Y., Gohlke, P.: Neuroprotective effects of AT₁ receptor antagonists after experimental ischaemic stroke: What is important? J Hypertens 2015 (submitted)